



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 244 297**

⑫ Número de solicitud: 200302587

⑮ Int. Cl.7: **A61K 39/395**

C07K 14/705

A61P 37/00

⑫

SOLICITUD DE ADICIÓN A LA PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.11.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2005**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.12.2005

⑮ Número de solicitud de la patente principal:
200300252

⑰ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
Ctra. Colmenar, Km. 15
28001 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
Pilar Lauzurica Gómez**

⑰ Inventor/es: **Sánchez-Madrid, Francisco;
Sancho Madrid, David;
Lauzurica Gómez, Pilar;
Espulgues Artola, Enric;
Vega Ramos, Javier;
Engel Rocamora, Pablo y
Martínez Alonso, Carlos**

⑰ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑮ Título: **Mejoras introducidas en la patente de invención nº 200300252 correspondiente a: "Una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la activación leucocitaria CD69".**

⑰ Resumen:

Mejoras introducidas en la patente de invención nº 200300252 correspondiente a: "Una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la activación leucocitaria DC69".

Mejoras introducidas en la patente de invención nº PV200300252 correspondiente a la utilización de una cantidad efectiva de una molécula de activación temprana, la cual es una molécula de anticuerpo antagonista anti-CD69 seleccionado de entre una molécula de anticuerpo humanizada anti-CD69, una molécula de anticuerpo humana anti-CD69, una molécula de anticuerpo quimérica anti-CD69 y una molécula de anticuerpo de inmunización anti-CD69 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que necesite, o pueda beneficiarse de, una respuesta inmune aumentada, en donde dicho antagonista disminuye la señalización por la molécula de activación temprana o reduce la interacción de la molécula de activación temprana con un ligando de dicha molécula de activación temprana.

ES 2 244 297 A1

DESCRIPCIÓN

Mejoras introducidas en la patente de invención nº 200300252 correspondiente a: “Una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la activación leucocitaria CD69”.

Objeto de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a una Patente de Adición relativa a una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la activación leucocitaria CD69, en la cual se demuestra el papel inhibidor de una molécula de activación temprana perteneciente a la familia de las lectinas tipo C y cuyo gen se sitúa en la región génica del complejo NK, CD69, en las reacciones inmunitarias mediante la regulación de la síntesis de TGF- β 1.

También en esta invención se demuestra que el empleo de anticuerpos monoclonales específicos para CD69, constituye una terapia eficaz en tumores inducidos en ratones.

El papel de las moléculas de activación temprana como moduladores de la respuesta inmunitaria sugiere el empleo de estas moléculas como dianas tanto para la estimulación de la respuesta inmune en terapias contra el cáncer, infecciones, inmunodeficiencias o vacunación, como para el control de respuestas exacerbadas, en el caso de la inflamación crónica, autoinmunidad, alergia o trasplantes.

Campo de la invención

La manipulación de las moléculas de activación temprana como reguladores inmunes puede impulsar el desarrollo de nuevos tratamientos para el reajuste de la respuesta inmunitaria, incluyendo regulación negativa en el caso de enfermedades autoinmunes y alergias, o positiva en casos de formación de tumores, vacunación y terapias contra inmunodeficiencias.

El desarrollo de estos métodos se fundamenta en el hallazgo de mecanismos para emplear las moléculas de activación temprana como dianas terapéuticas. Por lo tanto, debe adscribirse al sector farmacológico para su aplicación en el sector sanitario.

Antecedentes de la invención

El tratamiento farmacológico de las enfermedades inmunitarias es un campo de intenso estudio, incluyéndose en esta categoría las enfermedades autoinmunes, que afectan aproximadamente al 5% de la población mundial (O’Shea *et al.*, 2002), rechazo de trasplantes, alergia, aterosclerosis, enfermedades infecciosas y procesos tumorales que son una causa mayoritaria de mortalidad en países industrializados. Por tanto, la regulación de la respuesta inmune es crucial en el tratamiento de las causas más importantes de muerte y morbilidad en nuestra sociedad.

CD69 es una molécula que se expresa rápida y transitoriamente durante la activación de los leucocitos tras un desafío inmune (Cebrián *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1986; Testi *et al.*, 1994). CD69 se expresa en todos los linajes hematopoyéticos excepto eritrocitos, y aunque se detecta *in vivo* en algunos subtipos de linfocitos T y B en tejidos linfoides periféricos (Sánchez-Mateos *et al.*, 1989), su expresión es mucho más intensa y persistente en infiltrados leucocitarios de diversas enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide y hepatitis viral crónica (García-Monzón *et al.*, 1990; Laffón *et al.*, 1991), en los leucocitos responsables del rechazo de trasplantes (Mampaso *et al.*, 1993), los leucocitos involucrados en la respuesta alérgica (Hartnell *et al.*, 1993), células inmunitarias en las lesiones ateroscleróticas (Caspar-Bauguil *et al.*, 1998), linfocitos que infiltran tumores (Coventry *et al.*, 1996) o durante infecciones persistentes (Zajac *et al.*, 1998). Existen evidencias de que CD69 está involucrado en la activación de células derivadas de la médula ósea (Cebrián *et al.*, 1988; Testi *et al.*, 1994).

No obstante, el desarrollo hematopoyético y la maduración de los linfocitos T son casi normales en ratones deficientes para CD69 en condiciones fisiológicas (Lauzurica *et al.*, 2000). CD69, junto con otras dos proteínas, la lectina tipo C inducida durante la activación (AICL) y el transcrito tipo lectina (LLT-1), forman parte del complejo NK (Hammann *et al.*, 1997; Boles *et al.*, 1999). La expresión de proteínas CD69 aumenta a tiempos tempranos tras la activación celular (Eichler *et al.*, 2001).

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por la activación anormal y persistente de los leucocitos que contribuye a la patogénesis de la enfermedad.

Está bien establecido que las citocinas desempeñan un papel esencial en la patogenia de las enfermedades autoinmunes (Falcone y Sarvetnick, 1999). Por lo tanto, la eliminación de estas citocinas es la estrategia de referencia en los nuevos tratamientos de las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF) parece situarse como el primer eslabón de la cascada inflamatoria, y la terapia contra el TNF se ha empleado eficazmente en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) (Feldmann, 2002). Además, otras citocinas tienen un efecto antiinflamatorio.

En este contexto, la administración de TGF- β 1 tiene un efecto beneficioso en algunas enfermedades autoinmunes

(Prud'homme and Piccirillo, 2000), inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias en artritis (Kuruvilla *et al.*, 1991), encefalomiелitis alérgica, colitis (Powrie *et al.*, 1996) y diabetes autoinmune (Piccirillo *et al.*, 1998).

La respuesta inmune contra los tumores se comporta como “un eficaz sistema supresor de tumores extrínseco”, que implica la acción combinada de mecanismos humorales y celulares (Dighe, 1994; Kaplan, 1998; Shankaran, 2001; Smyth y Godfrey, 2000; Smyth *et al.*, 2000; Van den Broek, 1996).

La acción de las citocinas, dirigida, al menos en parte, a regular la inmunogenicidad de las células tumorales, es crucial para la función supresora de tumores del sistema inmune.

Las células de tumores avanzados y las metástasis inhiben la expresión de las moléculas de clase I del MHC, lo que las convierte en dianas susceptibles de ser destruidas por las células NK. Además, las células NK secretan citocinas, como TGF- β e IFN- γ , que estimulan la diferenciación de las células T CD4⁺ a células efectoras Th1 cooperadoras o “helper”. En este sentido, el IFN- γ ayuda a prevenir la formación de tumores, ya que los ratones deficientes para esta citocina desarrollan enfermedades neoplásicas espontáneas (Dighe, 1994; Kaplan, 1998).

Además, el TGF- β desempeña un papel inmunosupresor, inhibiendo por tanto la respuesta inmunitaria antitumoral mediante la regulación de la producción de citocinas proinflamatorias (Letterio y Roberts, 1998), lo que es dependiente del estadio celular y las citocinas presentes en el microentorno celular. El TGF- β se ha implicado en la modulación de los mecanismos efectores antitumorales por la alteración de la activación, proliferación y citotoxicidad de las células inmunes, macrófagos, células NK y linfocitos T (Gorelik y Flavell, 2000; Kehrl *et al.*, 1986).

Se ha descrito recientemente que el bloqueo de la señalización inducida por TGF- β aumenta la eficacia de la inmunidad antitumoral, ya que facilita la expansión de los linfocitos T CD8⁺ específicos contra el tumor (Gorelik y Flavell, 2001). Hay otras citocinas involucradas en la regulación del reclutamiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células efectoras antitumorales.

La quimiocina MCP-1, que es producida por muchos tipos celulares, activa el reclutamiento celular y los ratones deficientes para MCP-1 presentan deficiencias en las respuestas dependientes de linfocitos T (Allavena *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1997).

Por lo tanto, las citocinas desempeñan papeles esenciales en la inducción de la inmunidad antitumoral, y el bloqueo de las mismas puede constituir una terapia eficaz en distintos modelos humanos y murinos (Gill, 1995).

El efecto fibrogénico y otros efectos negativos del TGF- β puede limitar su empleo inmunoterapéutico en humanos (Border y Ruoshtali, 1992).

El TGF- β está involucrado en diversas condiciones patológicas y su empleo sistémico tiene un riesgo oncogénico, que puede explicar el elevado número de tumores observados en pacientes tratados con ciclosporina A (CsA), que es un fármaco que incrementa la producción sistémica de TGF- β (Rojo *et al.*, 1999). Por lo tanto, la regulación localizada del TGF- β puede resultar un tratamiento eficaz de las enfermedades inflamatorias crónicas, evitando las consecuencias negativas y los efectos secundarios del incremento generalizado de la expresión de esta citocina.

Descripción de la invención

La Patente de Adición relativa a una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la actuación leucocitaria CD69 correspondiente a la Patente de Invención número 200300252 se basa, en parte, en el descubrimiento de que la modulación de CD69 se puede usar para modular la respuesta inmune de un sujeto y así tratar una variedad de desórdenes de origen inmune.

Los antagonistas y eliminadores de CD69, son útiles, como se describe más tarde. CD69 y los ácidos nucleicos que codifican para ellos son referidos aquí como “moléculas de activación temprana”.

De acuerdo con esto, en un aspecto, la invención caracteriza métodos de tratamiento de un sujeto: p.e., un sujeto que está afectado por un desorden caracterizado por una respuesta inmune no deseada. El desorden se puede caracterizar por una respuesta considerada “normal” o por una respuesta inmune aumentada cuando se compara con lo que normalmente se observa en un sujeto.

Ejemplos de dichos desórdenes se indican aquí, e incluyen desórdenes inflamatorios agudos o crónicos y desórdenes inmunes, p.e., desórdenes autoinmunes.

En algunos ejemplos, el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria, p.e., una enfermedad inflamatoria aguda o crónica. Ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a: daño agudo de pulmón, síndrome de distress respiratorio agudo, artritis (p.e. AIC), asma, bronquitis, fibrosis quística, encefalomiелitis, hepatitis (p.e. hepatitis viral crónica), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, daño por reperfusión (p.e. miocárdica), nefritis, pancreatitis, psoriasis, oclusión arterial (p.e. de retina), accidente cerebro vascular, lupus eritematoso sistémico, trasplante (p.e. rechazo del trasplante por el huésped, p.e., tejido trasplantado tal como células madre hematopoiéticas o un órgano, p.e., un riñón, o respuesta contra el huésped provocada por el trasplante, p.e., enfermedad del injerto contra

el huesped), daño inducido por luz ultravioleta, y/o vasculitis. La enfermedad inflamatoria puede ser aguda o crónica, y es mediada preferiblemente por leucocitos. En algunos ejemplos, la enfermedad inflamatoria se asocia con la inflamación crónica, p.e. la enfermedad inflamatoria intestinal, tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide.

En un aspecto, la invención caracteriza métodos de tratamiento de un sujeto, p.e. un sujeto que tiene un desorden caracterizado por una respuesta inmune no deseada. El desorden se puede caracterizar por una respuesta inmune que es aumentada respecto a lo que normalmente se ve en un sujeto. Ejemplos de tales desórdenes se indican aquí e incluyen desórdenes inflamatorios agudos o crónicos, y desórdenes inmunes, p.e. desórdenes autoinmunes. El método incluye administrar una cantidad efectiva de un eliminador de células que expresan una molécula de activación temprana al sujeto, p.e., una célula que exprese CD69.

Ejemplos de eliminadores de células que expresan la molécula de activación temprana incluyen aquellos descritos aquí, pero no están limitados a, moléculas de anticuerpo que se unan a CD69 y eliminen células que expresan CD69, p.e. un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.3 (Esplugues *et al.*) o cualquier anticuerpo anti-CD69 de la bibliografía que pueda actuar como eliminador de células que expresan CD69 (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento del anticuerpo o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se une tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo, moléculas de anticuerpo que se unan a AICL y eliminen células que expresan AICL, p.e. un anticuerpo anti-AICL, p.e., cualquier anticuerpo anti-AICL de la bibliografía que pueda actuar como eliminador de células que expresan AICL (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento del anticuerpo o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se une tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo; moléculas de anticuerpo que se unan a LLT1 y eliminen células que expresan LLT1, p.e. cualquier anticuerpo anti-LLT1 de la bibliografía que pueda actuar como eliminador de células que expresan LLT1 (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento del anticuerpo o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se une tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo; o una molécula de anticuerpo identificada por algún método descrito aquí. En un ejemplo, un anticuerpo anti molécula de activación temprana eliminador (p.e., un anticuerpo eliminador anti-CD69, una molécula de anticuerpo eliminador anti-AICL, o una molécula de anticuerpo eliminador anti-LLT1) puede reclutar una célula inmune (p.e., vía un receptor de Fc o por reclutamiento del sistema de complemento) e inactivar o lisar la célula diana, p.e., la célula que expresa la molécula de activación temprana. En otro ejemplo, el eliminador de la molécula de activación temprana puede activar la vía clásica del complemento que lleva a la eliminación de la célula diana, (p.e., la célula que expresa CD69, AICL, y/o LLT1). En otro ejemplo, el eliminador es un anticuerpo anti-molécula de activación temprana que está unido a un agente terapéutico, p.e., una proteína, droga o isótopo, que puede inactivar o destruir la célula diana, p.e. la célula que expresa CD69, AICL, y/o LLT1.

En algunos ejemplos, el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria, p.e., una enfermedad inflamatoria aguda o crónica. Ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a: daño agudo de pulmón, síndrome de distress respiratorio agudo, artritis (p.e. AIC), asma, bronquitis, fibrosis quística, diabetes autoinmune, encefalomiелitis, hepatitis (p.e. hepatitis viral crónica), enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, daño por reperusión (p.e. miocárdica), nefritis, pancreatitis, psoriasis, oclusión arterial (p.e. de retina), accidente cerebro vascular, lupus eritematoso sistémico, trasplante (p.e. rechazo del trasplante por el huesped, p.e., tejido trasplantado tal como células madre hematopoiéticas o un órgano, p.e., un riñón, o respuesta contra el huésped provocada por el trasplante, p.e., enfermedad del injerto contra el huesped), daño inducido por luz ultravioleta, y/o vasculitis. La enfermedad inflamatoria puede ser aguda o crónica, y es mediada preferiblemente por leucocitos. En algunos ejemplos, la enfermedad inflamatoria se asocia con la inflamación crónica, p.e. la enfermedad inflamatoria intestinal, tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide.

En un ejemplo preferido, el método incluye administrar uno o más eliminadores de células que expresan una molécula de activación temprana en combinación con un segundo agente terapéutico, p.e. un agente terapéutico o un agente para tratar la inflamación. El segundo agente puede ser un anticuerpo o un agente diferente.

El sujeto puede ser un mamífero, p.e. un primate, preferiblemente un primate superior, p.e. un humano.

En algunos ejemplos, el eliminador de células que expresan la molécula de activación temprana puede ser administrado al sujeto sistémicamente (p.e., oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, intravenosa, por vía rectal, intramuscularmente, intraperitonealmente, intranasalmente, por vía transdérmica, o por inhalación o por administración intracavitaria), tópicamente, o por aplicación a las membranas mucosas, tales como la nariz, la garganta o los bronquios. En algunos casos, el eliminador de la molécula de activación temprana puede ser administrado antes o durante una respuesta inmune secundaria en el sujeto.

En un ejemplo preferido, el eliminador de la molécula de activación temprana se administra de manera repetida. P.e., el eliminador se puede administrar 2, 4, 6 o más veces. La administración puede ser repetida hasta que la mejora en la condición del sujeto se vea o se espere. La administración puede ser a una frecuencia de una cada 5 a 7 días, 14 a 30 o 30 a 60 días. La administración de otros compuestos puede ser más frecuente. Por ejemplo, una pequeña molécula puede administrarse una, dos, tres, cuatro o más veces al día.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos de tratamiento de un sujeto, p.e., un sujeto que necesite o un sujeto que podría beneficiarse de, una respuesta inmune aumentada. El sujeto puede tener un desorden caracterizado por una respuesta inmune disminuida, p.e., una respuesta inmune que está reducida comparado con lo que se ve en la ausencia de dicho desorden, p.e. el sujeto podría tener una inmunodeficiencia. En otros ejemplos, el sujeto no tiene una respuesta inmune disminuida o comprometida, pero se beneficiaría de una respuesta inmune aumentada. Por ejemplo, el sujeto podría tener un desorden caracterizado por células o tejidos no deseados, o caracterizado por una proliferación celular anormal, tal como sucede en el cáncer. El método puede ser también usado para aumentar la respuesta inmune en un sujeto, p.e. una respuesta inmune a un antígeno (p.e. una vacuna). El método incluye la administración de uno o más antagonistas de la molécula de activación temprana (p.e., un antagonista de CD69, un antagonista de AICL, un antagonista de LLT1, o combinaciones de los mismos) al sujeto.

Ejemplos de antagonistas de molécula de activación temprana incluyen, pero no se limitan a, antisentido de molécula de activación temprana (p.e., antisentido de CD69, AICL, o LLT1), RNAi para interferir con el mensajero para molécula de activación temprana, una molécula de anticuerpo antagonista para anti-CD69, una molécula de anticuerpo antagonista para anti-AICL, una molécula de anticuerpo antagonista para anti-LLT1, y otros compuestos identificados por algún método descrito aquí, p.e., compuestos que interaccionan con uno o más de CD69, AICL, y LLT1 y disminuyen la expresión de TGF- β por una célula y pequeñas moléculas que se unen a una molécula de activación temprana y antagonicen su actividad. Ejemplos de pequeñas moléculas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos (p.e. peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos e inorgánicos (incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) con peso molecular menor de unos 5000 g/mol, y sales, ésteres y otras formas aceptables farmacológicamente de tales compuestos. Ejemplos de otros antagonistas de moléculas de activación temprana incluyen, pero no se limitan a: antagonistas del receptor de CD69 (CD69R), polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, antagonistas del receptor de AICL (AICLR), polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, antagonistas del receptor de LLT1 (LLT1R), polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, formas solubles de CD69R, formas solubles de AICL-R, formas solubles de LLT1-R, proteínas de fusión antagonistas de CD69R, AICL-R, o LLT1-R, p.e., proteínas de fusión de antagonistas de un receptor de un polipéptido de activación temprana con proteínas del suero (p.e. proteínas de fusión de CD69R con inmunoglobulinas, o de CD69R con albúmina de suero humana proteínas de fusión de AICL-R con inmunoglobulinas, o de AICL-R con albúmina de suero humana proteínas de fusión de LLT1-R con inmunoglobulinas, o de LLT1-R con albúmina de suero humana) o otras formas de proteínas de fusión antagonistas de un receptor de un polipéptido de activación temprana diseñadas para aumentar la vida media en el suero y/o la multivalencia.

Ejemplos de moléculas de anticuerpo antagonistas de anti-polipéptido de activación temprana incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unen un polipéptido de activación temprana e interfieren con la unión del polipéptido de activación temprana y un polipéptido que se une a una proteína de activación temprana y moléculas de anticuerpo que se unen a un polipéptido de activación temprana y disminuyen la expresión del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula, p.e., por internalización del polipéptido de activación temprana. Las moléculas de anticuerpo anti-CD69 antagonistas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unen CD69 e interfieren con la unión de CD69 a una pareja de unión a CD69, y moléculas de anticuerpo que se unen a CD69 y disminuyen la expresión de CD69 en la superficie de la célula. Ejemplos de moléculas de anticuerpo antagonistas anti-CD69 incluyen un anticuerpo anti-CD69 humano, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.2 o a cualquier anticuerpo anti-CD69, p.e., un anti-CD69 conocido en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en el, p.e. un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico) o una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, o una molécula que compita por la unión con tal anticuerpo, o una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor, o ligando a uno o más de los residuos de aminoácidos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188 del CD69 humano. Las moléculas de anticuerpo anti-AICL antagonistas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unen a AICL e interfieren con la unión de AICL a una pareja de unión a AICL, y moléculas de anticuerpo que se unen a AICL y disminuyen la expresión de AICL en la superficie de la célula. Ejemplos de una molécula de anticuerpo anti-AICL antagonista incluyen un anticuerpo anti-AICL humano, p.e., un anticuerpo anti-AICL, p.e., un anticuerpo anti-AICL conocido en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en el, p.e. un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico) o una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, o una molécula que compita por la unión con tal anticuerpo, o una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo o ligando a uno o más de los residuos de aminoácidos del 37 al 149 del AICL humano. Las moléculas de anticuerpo anti-LLT1 antagonistas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unen LLT1 e interfieren con la unión de LLT1 a una pareja de unión a LLT1 y moléculas de anticuerpo que se unen a LLT1 y disminuyen la expresión de LLT1 en la superficie de la célula. Ejemplos de antagonistas de moléculas de anticuerpo anti-LLT1 incluyen cualquier anticuerpo anti-LLT1, p.e., un anti-CD69 conocido en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en el, p.e. un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico) o una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, o una molécula que compita por la unión con tal anticuerpo, o una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor, o ligando a uno o más de los residuos de aminoácidos 76 a 132 del LLT1 humano.

En algunos ejemplos, el sujeto tiene una enfermedad caracterizada por la proliferación no deseada de células malignas o no malignas, p.e. cáncer. Ejemplos de cancer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de tracto biliar, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago,

cáncer gástrico, neoplasias intraepiteliales, leucemias (p.e., leucemia linfocítica crónica B, p.e., leucemia linfocítica crónica B que no tenga mutaciones en las inmunoglobulinas), linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (p.e. de células pequeñas y de células no pequeñas), melanoma, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de recto, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En un ejemplo, el cáncer es un tumor que no expresa CD69, AICL, y/o LLT1. En otro ejemplo, el cancer es una leucemia linfocítica crónica B sin mutación en las inmunoglobulinas y al sujeto se le administra un antagonista de una molécula de activación temprana, p.e., un antagonista de AICL.

En un ejemplo preferido, el método incluye la administración de un antagonista de una molécula de activación temprana en combinación con un agente secundario, p.e., con uno o más agentes terapéuticos, p.e., un agente terapéutico o agente para el tratamiento de la proliferación celular no deseada. El segundo agente puede ser un anticuerpo o no. Los agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, uno o más agentes quimioterápicos, radioisótopos, o citotoxinas. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen el taxol, la citocalasina B, la gramicidina D, la mitomicina, el etopóxido, el tenopóxido, la vincristina, la vinblastina, la colchicina, el busulfan, el cisplatino, la doxorubicina, la claurubicina, la dihidroxi-antracina-diona, la mitoxantrona, la mitamicina, el clorambucilo, la gencitabina, la actinomicina, la procaína, la tetracaína, la lidocaína, el propanolol, la puomicina, los maitansinoides y análogos u homólogos de estos. Agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p.e. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (p.e., mecloretamina, tioepa-clorambucilo, CC-1065, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p.e. daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.e., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p.e. vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides). Los radioisótopos pueden incluir emisores alfa, beta y/o gamma. Ejemplos de radioisótopos son: ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{211}At , ^{186}Re , ^{90}Y y ^{117}Lu . El antagonista de la molécula de activación temprana se puede administrar antes, durante o tras el tratamiento con el otro agente terapéutico.

En un ejemplo, el sujeto tiene una inmunodeficiencia, p.e., síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), una inmunodeficiencia hereditaria, o una inmunodeficiencia causada por la exposición a un agente ambiental o medicinal (p.e., un agente quimioterápico o un tratamiento de radiación).

En otro ejemplo, el sujeto tiene un desorden hiperproliferativo no patológico, p.e., fibrosis. El desorden fibrótico puede asociarse con uno o más de: traumatismo, cirugía, infección, polución ambiental, alcohol, tabaco y otras toxinas. El desorden puede asociarse con, p.e., uno o más de: reparación de heridas hipertrófica (p.e., cicatrices hipertróficas y queloides), fibrosis renal (proliferación de células mesangiales), fibrosis de hígado (proliferación de células estelares del hígado). Ejemplos de desórdenes fibróticos incluyen: queloides, quemaduras, cicatrices hipertróficas u otros desórdenes de la piel (p.e., esclerodermia local o sistémica, p.e., esclerosis sistémica con esclerodermia), cirrosis hepática, fibrosis renal (p.e. relacionada con diabetes o hipertensión), adhesiones quirúrgicas (p.e. tras cirugía gastrointestinal o adhesiones de neocirugía), trasplantes vasculares, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por radiación, fibrosis relacionada con el asbesto (p.e. pulmón marrón o negro), fibrosis asociada con hepatitis viral, degeneración macular, retinopatía vítrea y retinal, y fibrosis asociada con síndrome respiratorio agudo. La fibrosis puede ser de tipo agudo o crónico. Ejemplos de fibrosis aguda incluyen: heridas accidentales, infecciones, cirugía, quemaduras, fibrosis inducida por radiación y fibrosis inducida por quimioterapia. La fibrosis crónica se puede asociar con, p.e., infecciones virales, diabetes e hipertensión.

El sujeto puede ser un mamífero, p.e. un primate, preferiblemente un primate superior, p.e. un humano.

En algunos ejemplos, el antagonista de la molécula de activación temprana puede ser administrado al sujeto sistémicamente (p.e., oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, intravenosa, por vía rectal, intramuscularmente, intraperitonealmente, intranasalmente, por vía transdérmica, o por inhalación o por administración intracavitaria), tópicamente, o por aplicación a las membranas mucosas, tales como la nariz, la garganta o los bronquios.

En un ejemplo preferido, el antagonista de la molécula de activación temprana se administra de manera repetida. P.e., el antagonista de CD69 se puede administrar 2, 4, 6 o más veces. La administración puede ser repetida hasta que la mejora en la condición del sujeto se vea o se espere. La administración puede ser a una frecuencia de una cada 5 a 7 días, 14 a 30 o 30 a 60 días. La administración de otros compuestos puede ser más frecuente. Por ejemplo, una pequeña molécula puede administrarse una, dos, tres, cuatro o más veces al día.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos de potenciación de la respuesta inmune a un antígeno, p.e. una vacuna. El método incluye la administración a un sujeto de un antígeno p.e., una vacuna, y/o un DNA que codifique para un antígeno, y un antagonista de la molécula de activación temprana, para de esta forma potenciar la respuesta inmune al antígeno por parte del sujeto.

Ejemplos de antagonistas de la molécula de activación temprana incluyen aquellos descritos aquí.

En algunos ejemplos, el antagonista de la molécula de activación temprana es una molécula de anticuerpo anti-molécula de activación temprana, p.e., una molécula de anticuerpo anti-CD69, una molécula de anticuerpo anti-AICL, una molécula de anticuerpo anti-LLT1, (p.e., un anticuerpo anti-CD69 antagonista, un anticuerpo anti-AICL antagonista, un anticuerpo anti-LLT1 antagonista descrito aquí).

Ejemplos de dosis de antígeno que pueden usarse incluyen 100 mg de antígeno para la inmunización primaria y, al menos 21 días después, 100 mg de antígeno en una inmunización secundaria. Los títulos esperados deberían ser mayores al menos para los isotipos Th1, tales como la IgG2a, IgG2b, y IgG3 de ratón, o lo isotipos análogos en humano.

Ejemplos de vacunas pueden incluir, vacunas de cáncer (p.e., vacunas frente al melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cancer de próstata, cáncer colorectal, cáncer pancreático, o cáncer de hígado), vacunas frente al HIV, vacunas frente a la hepatitis (p.e., tipo A, B, o C), vacunas frente a la malaria, vacunas frente al herpes, vacunas frente al papiloma (p.e., HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33 y/o 45), vacunas frente a la gripe y vacunas frente a la viruela.

El antagonista de la molécula de activación temprana se puede administrar al sujeto, antes, durante o tras la administración del antígeno y/o ácido nucleico que codifique para el antígeno.

En otro aspecto, la invención caracteriza métodos de tratamiento o prevención de un cáncer que exprese una molécula de activación temprana en un sujeto, p.e., un cáncer que exprese CD69, AICL, y/o LLT1 en un sujeto. El método incluye la administración de un eliminador de la célula que expresa la molécula de activación temprana y/o un antagonista de la molécula de activación temprana al sujeto.

Ejemplos de cánceres que expresan moléculas de activación temprana incluyen: linfomas (p.e., linfomas de células T (p.e., linfoma cutáneo de células T (Berti *et al.*, 1991. J. Invest. Dermatol.96:718-23); linfomas de células T periféricas (Dorfman *et al.* 2002, Hum. Pathol. 33:330-4)), linfomas de células B, linfomas no Hodgkin (p.e., linfomas de Hodgkin T ó B (Erlanson *et al.*, 1998. Eur. J. Haematol. 60:125-32)), leucemia linfática (p.e., leucemia linfática crónica T ó B (Damle *et al.* 2002, Blood 99:4087-93), p.e., leucemia linfática crónica B sin mutaciones en las inmunoglobulinas (Klein *et al.*, 2001 J. Exp. Med. 11:1625; Rosenwald *et al.*, 2001 J. Exp. Med. 11:1639)) y otros tumores de origen hematopoyético (Tassone *et al.* 1996. Tissue Antigens 48:65-8).

Ejemplos de eliminadores de células que expresan moléculas de activación temprana incluyen aquellos descritos aquí, pero no se limitan a ellos, tales como moléculas de anticuerpo que se unen a una molécula de activación temprana y eliminan células que expresan la molécula de activación temprana. Ejemplos de un eliminador de una célula que expresa una molécula de activación temprana incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que se unen a CD69 y eliminan células que expresan CD69, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.3 o cualquier anticuerpo anti-CD69 humano p.e., un anticuerpo conocido en la bibliografía que pueda actuar como eliminador de las células que expresan CD69 (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimérico, humanizado o desinmunogénico), una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo, moléculas de anticuerpo que se unen a AICL y eliminan células que expresan AICL, p.e., cualquier anticuerpo anti-AICL humano, p.e., un anticuerpo conocido en la bibliografía que pueda actuar como eliminador de las células que expresan AICL (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimérico, humanizado o desinmunogénico), una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo, moléculas de anticuerpo que se unen a LLT1 y eliminan células que expresan LLT1, p.e., cualquier anticuerpo anti-LLT1 humano, p.e., un anticuerpo conocido en la bibliografía que pueda actuar como eliminador de las células que expresan LLT1 (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimérico, humanizado o desinmunogénico), una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, una molécula de anticuerpo que compita por la unión con tal anticuerpo, o una molécula de anticuerpo identificada por un método descrito aquí. En un ejemplo, una molécula de anticuerpo eliminador anti-polipéptido de activación temprana puede reclutar una célula inmune (p.e., por vía de un receptor Fc o por reclutamiento del sistema de complemento) e inactivar o destruir la célula diana, p.e., la célula que expresa el polipéptido de activación temprana. En otro ejemplo, la molécula de anticuerpo eliminador anti-polipéptido de activación temprana puede activar la vía clásica de complemento, llevando a la lisis de la célula diana (p.e., la célula que expresa CD69, AICL, o LLT1). En otro ejemplo, el eliminador es una molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana acoplada a un agente terapéutico, p.e., una proteína, droga o isótopo, que pueden inactivar o destruir la célula diana, p.e., la célula que expresa el polipéptido de activación temprana.

En un ejemplo preferido, el método incluye la administración de un eliminador de células que expresan una molécula de activación temprana en combinación con un agente secundario, p.e., con uno o más agentes terapéuticos, p.e., un agente terapéutico o agente para el tratamiento de la proliferación celular no deseada. El segundo agente puede ser un anticuerpo o no. Los agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, uno o más agentes quimioterápicos, radioisótopos, o citotoxinas. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen el taxol, la citocalasina B, la gramicidina D, la mitomicina, el etopóxido, el tenopóxido, la vincristina, la vinblastina, la colchicina, el busulfan, el cisplatino, la doxorubicina, la clauorubicina, la dihidroxi-antracina-diona, la mitoxantrona, la mitamicina, el clorambucilo, la gencitabina, la actinomicina, la procaína, la tetracaína, la lidocaína, el propanolol, la puromicina, los maitansinoides y análogos u homólogos de estos. Agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p.e. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (p.e., mecloretamina, tioepa-clorambucilo, CC-1065, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p.e. daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.e., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p.e., vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides). Los radioisótopos pueden incluir emisores alfa, beta y/o gamma. Ejemplos de radioisótopos son: ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{211}At .

¹⁸⁶Re, ⁹⁰Y y ¹¹⁷Lu. El eliminador de la molécula de activación temprana se puede administrar antes, durante o tras el tratamiento con el otro agente terapéutico.

El sujeto puede ser un mamífero, p.e. un primate, preferiblemente un primate superior, p.e. un humano (p.e., un paciente que tiene un cáncer que expresa una molécula de activación temprana).

En algunos ejemplos, el eliminador de células que expresan la molécula de activación temprana puede ser administrado al sujeto sistémicamente (p.e., oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, intravenosa, por vía rectal, intramuscularmente, intraperitonealmente, intranasalmente, por vía transdérmica, o por inhalación o por administración intracavitaria), tópicamente, o por aplicación a las membranas mucosas, tales como la nariz, la garganta o los bronquios.

En un ejemplo preferido, el eliminador de la molécula de activación temprana se administra de manera repetida. P.e., el eliminador de CD69 se puede administrar 2, 4, 6 ó más veces. La administración puede ser repetida hasta que la mejora en la condición del sujeto se vea o se espere. La administración puede ser a una frecuencia de una cada 5 a 7 días, 14 a 30 ó 30 a 60 días. La administración de otros compuestos puede ser más frecuente. Por ejemplo, una pequeña molécula puede administrarse una, dos, tres, cuatro o más veces al día.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para la identificación de compuestos que modulen una molécula de activación temprana, p.e., antagonistas de CD69, AICL, o LLT1 o eliminadores de células que expresan CD69, AICL, o LLT1 para de esta manera modular una respuesta inmune. El método incluye: contactar una célula que expresa una molécula de activación temprana con un compuesto (p.e., un compuesto que interacciona con, p.e., se une a, la molécula de activación temprana) y determinar el efecto del compuesto en la expresión o actividad de la molécula de activación temprana. La expresión de una molécula de activación temprana se puede determinar, p.e., por la determinación de la expresión de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de activación temprana, por la expresión de dicho polipéptido, y/o por la expresión del polipéptido de activación temprana en la superficie de una célula.

En un ejemplo preferido, el método incluye: contacto de un polipéptido de activación temprana, p.e., CD69, AICL, o LLT1, o una forma soluble del polipéptido de activación temprana (p.e., una forma soluble de CD69, p.e., un polipéptido de CD69 que carece de la región transmembrana y/o citoplásmica, una forma soluble de AICL, p.e., un polipéptido de AICL que carece de la región transmembrana y/o citoplásmica, una forma soluble de LLT1, p.e., un polipéptido de LLT1 que carece de la región transmembrana y/o citoplásmica) con un compuesto, y evaluar la capacidad del compuesto para interaccionar con, unirse a, el polipéptido de activación temprana o la forma soluble del polipéptido de activación temprana.

Un compuesto que reduce la expresión de una molécula de activación temprana y/o la actividad puede identificarse como un compuesto que aumenta la respuesta inmune. En un ejemplo preferido, la actividad de la molécula de activación temprana que decrece es la expresión de TGF- β y/o la inhibición de la formación del dímero de la molécula de activación temprana, p.e., formación de dímeros de CD69, AICL o LLT1. En un ejemplo, un compuesto puede ser evaluado en su capacidad para disminuir la expresión de la molécula de activación temprana (p.e., la expresión del ácido nucleico, del polipéptido, y/o de la expresión en la superficie celular) y/o la actividad celular de la molécula de activación temprana, p.e., expresión de TGF- β , en ausencia o presencia del compuesto. Preferiblemente, el compuesto interacciona con, p.e., se une a la molécula de activación temprana. Posibles compuestos incluyen, p.e., pequeñas moléculas (p.e., pequeñas moléculas descritas aquí), péptidos, polipéptidos de fusión (p.e., la proteína de fusión de CD69R, la proteína de fusión de AICL-R, o la proteína de fusión de LLT1-R descritas aquí), moléculas de anticuerpo y moléculas de ácido nucleico. Ejemplos de moléculas de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo o intracuerpos que se unen a una molécula de activación temprana e interfieren con la unión de la molécula de activación temprana y un polipéptido de unión a la molécula de activación temprana y moléculas de anticuerpo que se unen a un polipéptido de activación temprana y disminuyen el nivel del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula, p.e., por internalización. Ejemplos de anticuerpos anti-CD69 incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que se unen a CD69 en interfieren con la unión de CD69 a una pareja de unión a CD69 p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo anti-CD69 2.2. o cualquier anti-CD69 humano, p.e., un anticuerpo descrito en la bibliografía, que pueda actuar como antagonista (o moléculas de anticuerpo basadas en él), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a uno o más de uno de los residuos aminoácidos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188 del CD69 humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí. Ejemplos de anticuerpos anti-AICL incluyen un anticuerpo anti-AICL humano, p.e., cualquier anti-AICL, p.e., un anticuerpo descrito en la bibliografía, que pueda actuar como antagonista (o moléculas de anticuerpo basadas en él), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a uno o más de uno de los residuos aminoácidos 37 a 149 del AICL humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí. Ejemplos de anticuerpos anti-LLT1 incluyen un anticuerpo anti-LLT1 humano, p.e., cualquier anti-LLT1, p.e., un anticuerpo descrito en la bibliografía, que pueda actuar como antagonista (o moléculas de anticuerpo basadas en él), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a

uno o más de uno de los residuos aminoácidos 76 a 132 del LLT1 humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí.

En algunos ejemplos, el ensayo basado en células mide una actividad de una molécula de activación temprana, p.e., expresión de TGF- β disminuida, activación disminuida de MAPK, menor señalización de Ca²⁺ y/o formación de dímeros de CD69, AICL o LLT1 reducida. Los compuestos que disminuyen la expresión de TGF- β y/o la formación de dímeros pueden seleccionarse como antagonistas de la molécula de activación temprana.

En otros ejemplos, el ensayo basado en células mide la modulación, p.e., una disminución, de la expresión de una molécula de activación temprana. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de activación temprana o la expresión de un ácido nucleico (p.e., mRNA o cDNA) para CD69, en la presencia de un compuesto puede ser evaluada y comparada a la expresión de la molécula de activación temprana en la célula antes de la administración del compuesto. Una disminución en el nivel de expresión es cualquier disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de la molécula de activación temprana. En otros casos, el ensayo basado en células mide la modulación, p.e., la disminución en el nivel de los polipéptidos de activación temprana en la superficie de la célula, p.e, comparado con los niveles del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula antes de la administración del compuesto.

En un ejemplo, un compuesto que inhiba la expresión y/o la actividad de una molécula de activación temprana, p.e., la expresión de TGF- β , de la célula, es seleccionado, p.e., seleccionado para una mayor búsqueda, p.e., por administración del compuesto a un sujeto, p.e., en un modelo animal, p.e., en un modelo animal de proliferación celular no deseada (p.e., un modelo animal para cáncer), un modelo animal para inmunodeficiencia, y/o un modelo animal para medir la eficacia de una vacuna.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método de identificar un compuesto que module la respuesta inmune. El método incluye: la búsqueda de un compuesto que interaccione con, p.e., se una a, un polipéptido de activación temprana o un ácido nucleico que codifique para un polipéptido de activación temprana (p.e., la región reguladora de un gen de activación temprana), y determinar el efecto del compuesto en la expresión y/o la actividad de la molécula de activación temprana, p.e., la expresión de TGF- β y/o la formación de dímeros, p.e., la formación de dímeros por CD69, AICL o LLT1.

En un ejemplo, la interacción entre el compuesto y el polipéptido de activación temprana se evalúa *in vitro*, p.e., usando un polipéptido de activación temprana aislado, p.e., una forma soluble de CD69, AICL y/o LLT1 p.e., una forma soluble de CD69, AICL y/o LLT1 descrita aquí. El polipéptido de activación temprana y/o el compuesto puede estar en solución (p.e., una micela) o unido a un soporte sólido, p.e, una columna, microsfera, pocillo o placa o a un chip (p.e., un *microarray*). En algunos ejemplos, el método se repite una o más veces como esa, p.e., una librería de compuestos a probar puede ser evaluada.

En otro ejemplo, la interacción entre el compuesto y el polipéptido de activación temprana es evaluada usando un ensayo basado en células.

En un ejemplo preferido, un compuesto que interacciona con, p.e., se une a una molécula de activación temprana, se une con una célula que expresa la molécula de activación temprana para determinar el efecto del compuesto en la expresión y/o actividad de la molécula de activación temprana.

En otro ejemplo, el método incluye la identificación de un compuesto que interacciona con una molécula de activación temprana y disminuye la expresión y/o la actividad de la molécula de activación temprana, p.e., disminuye la expresión de TGF- β la activación de MAPK, la señalización por Ca²⁺ y/o la formación de dímeros, p.e., la formación de dímeros de CD69, AICL o LLT1, para así identificar el compuesto como un candidato para aumentar la respuesta inmune. La expresión de una molécula de activación temprana puede determinarse, p.e., determinando la expresión de un ácido nucleico que codifique para el polipéptido de activación temprana, por la expresión del mismo, y/o por la expresión del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula. En un ejemplo preferido, la actividad de la molécula de activación temprana que es reducida es la expresión de TGF- β y/o la formación de dímeros. En un ejemplo, un compuesto puede ser evaluado en su capacidad para disminuir la expresión y/o la actividad celular de la molécula de activación temprana, p.e., expresión de TGF- β , en ausencia o presencia del compuesto. Preferiblemente, el compuesto interacciona con, p.e., se une a la molécula de activación temprana. Posibles compuestos incluyen, p.e., pequeñas moléculas (p.e., pequeñas moléculas descritas aquí), péptidos, polipéptidos de fusión (p.e., la proteína de fusión de CD69R, la proteína de fusión de AICL-R, o la proteína de fusión de LLT1-R descritas aquí), moléculas de anticuerpo y moléculas de ácido nucleico. Ejemplos de moléculas de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo o intracuerpos que se unen a un polipéptido de activación temprana e interfieren con la unión del polipéptido de activación temprana y un polipéptido de unión al polipéptido de activación temprana y moléculas de anticuerpo que se unen al polipéptido de activación temprana y reducen su nivel de expresión en la superficie de la célula. Ejemplos de moléculas de anticuerpo anti-CD69 incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unan CD69 e interfieran con la unión de CD69 a una pareja de unión a CD69, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo anti-CD69 2.2. o cualquier anti-CD69 humano, p.e. un anticuerpo anti-AICL humano descrito en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un anticuerpo quimérico, de inmunizado, humanizado o un fragmento de anticuerpo), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita

con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a uno o más de uno de los residuos aminoácidos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188 del CD69 humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí. Ejemplos de moléculas de anticuerpo anti-AICL incluyen, p.e., un anticuerpo anti-AICL humano, p.e. un anticuerpo anti-AICL humano descrito en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un anticuerpo quimérico, deimmunizado, humanizado o un fragmento de anticuerpo), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a uno o más de uno de los residuos aminoácidos 37 a 149 del AICL humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí. Ejemplos de moléculas de anticuerpo anti-LLT1 incluyen, p.e., un anticuerpo anti-LLT1 humano, p.e. un anticuerpo anti-LLT1 humano descrito en la bibliografía que pueda actuar como antagonista (o una molécula de anticuerpo basada en él, p.e., un anticuerpo quimérico, deimmunizado, humanizado o un fragmento de anticuerpo), una molécula de anticuerpo que se una al epítipo al que se unen tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que compita con la unión de tales anticuerpos, una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro anticuerpo, receptor o ligando a uno o más de uno de los residuos aminoácidos 76 a 132 del AICL humano, u otra molécula de anticuerpo descrita aquí.

En algunos ejemplos, el ensayo basado en células mide una actividad de la molécula de activación temprana, p.e., expresión de TGF- β disminuida, activación disminuida de MAPK, menor señalización de Ca²⁺ y/o formación de dímeros reducida, p.e., dímeros de CD69, AICL o LLT1. Los compuestos que disminuyen la expresión de TGF- β y/o la formación de dímeros pueden seleccionarse como antagonistas de la molécula de activación temprana.

En otros ejemplos, el ensayo basado en células mide la modulación, p.e., una disminución, de la expresión de la molécula de activación temprana. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de activación temprana o la expresión de un ácido nucleico (p.e., mRNA o cDNA) para la molécula de activación temprana, en la presencia de un compuesto puede ser evaluada y comparada a la expresión de la molécula de activación temprana en la célula antes de la administración del compuesto. Una disminución en el nivel de expresión es cualquier disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de la molécula de activación temprana. En otros ejemplos, el ensayo de base celular mide la modulación, p.e., los niveles reducidos del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula, p.e., comparado con los niveles en la superficie de la célula antes de la administración del compuesto.

En un ejemplo, un compuesto que inhiba la expresión de una molécula de activación temprana y/o la actividad celular de una molécula de activación temprana, p.e., la expresión de TGF- β , es seleccionado, p.e., seleccionado para una mayor búsqueda, p.e., por administración del compuesto a un sujeto, p.e., en un modelo animal, p.e., en un modelo animal de proliferación celular no deseada (p.e., un modelo animal para cáncer), un modelo animal para inmunodeficiencia, y/o un modelo animal para medir la eficacia de una vacuna.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método de identificación de un compuesto que modula la respuesta inmune. Este método incluye: proveer con un compuesto que module la expresión de la molécula de activación temprana y/o su actividad, y administrar el compuesto a un sujeto, p.e., un modelo animal.

En un ejemplo, el compuesto aumenta la expresión de la molécula de activación temprana y/o aumenta una actividad de la molécula de activación temprana, p.e., la expresión de TGF- β , y/o aumenta la formación de dímeros (p.e., la formación de dímeros por CD69, AICL o LLT1), y el compuesto es administrado a un sujeto, p.e., un modelo animal, p.e., un modelo animal para una enfermedad inflamatoria (p.e., enfermedad inflamatoria aguda o crónica), y/o un modelo animal para un desorden inmune, p.e., un desorden autoinmune. Un ejemplo de un modelo animal para una enfermedad inflamatoria incluye un modelo de ratón para la artritis inducida por colágeno.

En otro ejemplo, el compuesto es un compuesto que disminuye la expresión de una molécula de activación temprana y/o la actividad de la molécula de activación temprana, p.e., reduce la expresión de TGF- β , de la célula y/o la formación de dímeros (p.e., la formación de dímeros por CD69, AICL o LLT1), y el compuesto es administrado a un sujeto, p.e., en un modelo animal, p.e., en un modelo animal de proliferación celular no deseada (p.e., un modelo animal para cáncer), un modelo animal para inmunodeficiencia, y/o un modelo animal para medir la eficacia de una vacuna, y compuestos que reduzcan uno o más síntomas del desorden se seleccionan.

El compuesto puede ser un compuesto identificado por un método descrito aquí o pueden ser otros compuestos que se sabe que interactúan con la molécula de activación temprana.

En otro aspecto, la invención caracteriza, un método de hacer una decisión, p.e., una decisión médica o financiera. El método incluye: generar o recibir datos o información en el tratamiento de un sujeto para un desorden descrito aquí; y usar los datos o información para tomar la decisión, p.e., seleccionar entre un primer resultado y un segundo resultado.

En un ejemplo preferido, los datos proceden de la respuesta a la administración de un agonista, antagonista, o eliminador de la molécula de activación temprana (p.e. un antagonista, o eliminador de CD69, AICL, o LLT1).

En un ejemplo preferido, la decisión se hace comparando los datos con un estándar de referencia y tomando la decisión basada en la relación de los datos con la referencia. Por ejemplo, los datos pueden ser un valor u otro término

para la respuesta de un sujeto, y si el valor u otro término tiene una relación preseleccionada con el estándar de referencia, p.e., si el valor o término de los datos es mayor que el estándar de referencia, se selecciona un primer resultado, y si los datos son menores que un estándar de referencia, se selecciona un segundo resultado. Un resultado puede producirse dándose o no un servicio o tratamiento, o pagando o no por todo o parte del servicio o tratamiento.

En un ejemplo preferido, el primer resultado sugiere o da un primer curso de tratamiento médico, p.e., cualquiera de los tratamientos descritos aquí, p.e., una administración adicional de un antagonista o eliminador de la molécula de activación temprana, y el segundo curso sugiere que el tratamiento no debe ser dado.

En un ejemplo preferido, el primer resultado incluye o resulta en la autorización o transferencia de fondos para el pago de un servicio o tratamiento dado al sujeto y el segundo resultado incluye o resulta en el rechazo al pago por un servicio o tratamiento dado al sujeto. Por ejemplo, una entidad, p.e., un hospital, entidad del gobierno, o compañía de seguros u otra entidad que pague por o reembolse costes médicos, puede usar el resultado de un método descrito aquí para determinar si un grupo, p.e., un grupo diferente al sujeto paciente, pagará por los servicios o tratamiento dados al paciente. Por ejemplo, una primera entidad, p.e., una compañía de seguros, puede usar el resultado para determinar si provee con la financiación a, o en representación de, un paciente, p.e., si reembolsará a un tercer grupo, p.e., un vendedor de productos o servicios, un hospital, médico, u otro profesional de la salud, por un servicio o tratamiento dado a un paciente. Por ejemplo, una primera entidad, p.e., una compañía de seguros, puede usar el resultado de un método descrito aquí para determinar si continúa, detiene, o enrola a un individuo en un plan de seguros o programa, p.e., un programa o plan de seguros de salud o de seguros de vida.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para proveer con una base de datos, p.e., una base de datos útil para establecer un valor de referencia referido aquí o para otros uno o más sujetos en evaluación. El método incluye: generar o recibir datos, p.e., respuesta a la administración de un antagonista o eliminador de la molécula de activación temprana (p.e., un antagonista o eliminador de CD69, AICL, o LLT1) en el tratamiento de un desorden, p.e., un desorden descrito aquí; e introducir los datos en la base de datos.

En un ejemplo preferido, uno o más de, un indicador (p.e., un valor) para el estado de la enfermedad de un paciente y un identificador del paciente son introducidos en la base de datos.

En un ejemplo preferido, la base de datos incluye una pluralidad de entradas, cada una de las cuales incluye uno o más de: datos (datos sobre la respuesta a la administración de antagonistas o eliminadores de la molécula de activación temprana en el tratamiento de un desorden, p.e., un desorden descrito aquí); un indicador para el estado de la enfermedad de un paciente y un identificador del paciente.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para la evaluación de un paciente que incluye: comparación de datos de los pacientes (datos sobre la respuesta de la administración de un antagonista y eliminador de la molécula de activación temprana en el tratamiento de un desorden, p.e., un desorden descrito aquí), con datos de una base de datos descrita aquí.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para construir un estándar de referencia que incluye: inclusión de datos procedentes de una base de datos descrita aquí en el estándar. Por ejemplo, se pueden tomar valores de la base de datos, realizar operaciones matemáticas con ellos y usar el resultado como una referencia para alcanzar un estándar de referencia, p.e., tomando la media de una pluralidad de valores seleccionados de la base de datos y usar la media como el estándar.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método de potenciar la producción de un anticuerpo frente a un antígeno. El método incluye la administración del antígeno al animal; y la administración de un antagonista de la molécula de activación temprana al animal.

El animal puede ser, p.e., un mamífero, p.e., un ratón, rata, cabra, oveja, cerdo, vaca o caballo.

En un ejemplo, el antígeno es homólogo al animal, p.e., el antígeno es de la misma especie que la especie del animal al que es administrado, p.e. el antígeno es un antígeno murino administrado a ratón. En otro ejemplo, el antígeno es heterólogo, p.e., el antígeno es de una especie diferente a la especie del animal al que es administrado, p.e., el antígeno es un antígeno humano administrado a un ratón.

En otro ejemplo, el método incluye además el aislamiento de una célula inmune del animal, p.e., para producir anticuerpos monoclonales.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la modulación de cualquiera de las moléculas de activación temprana, CD69, AICL, y LLT1 desempeña un papel en la reactividad inmune. Este efecto puede ser mediado a través de la regulación de la síntesis de TGF- β 1. CD69, AICL, y LLT1 son receptores estructuralmente similares localizados en el complejo génico NK y que pueden ser expresados en la mayoría de células de origen hematopoyético. Las tres proteínas tienen al menos un dominio lectina tipo C con similitud de secuencia significativa. Los niveles de CD69, AICL, y LLT1 aumentan significativamente en momentos tempranos tras la activación celular, a diferencia de otras proteínas tipo lectina asociadas con el complejo génico NK.

Nos hemos centrado en dos modelos diferentes de enfermedad en ratones para estudiar el papel de CD69 en la regulación de la respuesta inmunitaria. En primer lugar, la artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo experimental de enfermedad inflamatoria de las articulaciones, especialmente artritis reumatoide (AR) (Feldmann *et al.*, 1996). La AIC permite el estudio de los procesos de autoinmunidad y se puede ampliar a otras enfermedades en las que la respuesta autoinmune está exacerbada. Se ha encontrado que CD69 desempeña un papel inhibitorio a través de la regulación de TGF- β en el modelo de AIC. En segundo lugar, los modelos tumorales constituyen la estrategia opuesta, donde la meta consiste en la potenciación de la respuesta inmunitaria para suprimir los tumores y metástasis. Por lo tanto, este modelo constituye un sistema experimental para probar posibles terapias que se pueden extender a enfermedades infecciosas y síndromes de inmunodeficiencia para restablecer una respuesta inmunitaria eficaz. El posible empleo de CD69 en este contexto también se ha analizado en modelos de tumores y metástasis inducidas en ratón. Se ha encontrado que los anticuerpos monoclonales específicos frente a CD69 dan una terapia efectiva en ratones con tumores MHC-I negativos inmunocompetentes (wt) e inmuno-comprometidos (SCID&RAG1^{-/-}). Como ocurre con CD69, AICL y LLT1 se expresan a bajos niveles en leucocitos y son inducidos fuertemente y de manera transitoria tras la activación. Además, se ha descrito que el AICL aumenta en ciertos cánceres, tales como el B-CLL en líneas con las inmunoglobulinas no mutadas (Klein *et al.*, 2001 J. Exp. Med. 11:1625; Rosenwald *et al.*, 2001 J. Exp. Med. 11:1639). Esto puede resultar en la expresión aumentada de TGF- β , produciendo así un microentorno inmunosupresivo en sujetos que tienen este desorden.

La elucidación del papel de CD69 como un modulador negativo de la reactividad inmune, da un nueva e interesante aproximación a la terapia del cáncer, la inflamación crónica, y otras enfermedades mediadas por el sistema inmune (inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, trasplantes alogénicos, y otras como estas) por la modulación de CD69, AICL, y/o LLT1. Además, y dado que CD69, AICL, y LLT1 se expresan selectivamente en leucocitos activados que infiltran tejidos inflamados o tumores, la estimulación farmacológica de la síntesis de TGF- β a través de CD69, AICL, y/o LLT1 puede localizarse en los tejidos diana, evitándose por tanto las consecuencias negativas del incremento sistémico de TGF- β 1. Por otra parte, CD69, AICL, y/o LLT1 son marcadores adecuados para la identificación de los leucocitos tisulares activados. La eliminación de estas subpoblaciones mediante reactivos específicos de estas moléculas de activación temprana puede inhibir la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Por lo tanto, el antagonismo de una molécula de activación temprana p.e., inhibiendo la secreción de TGF- β , puede permitir una respuesta inmune local potenciada gracias al incremento en el reclutamiento y supervivencia de células inmunitarias (lo que sería adecuado para incrementar la respuesta a vacunas, terapia de inmunodeficiencias, etc.).

La descripción de moléculas inmunoregulatoras que posibilitan una activación o inhibición local y selectiva de la síntesis de TGF- β es, por tanto, una nueva aproximación al tratamiento de las enfermedades mediadas por el sistema inmune. Además, las moléculas de activación temprana pueden usarse como marcador específico de la población leucocitaria que está activamente produciendo citoquinas pro-inflamatorias en los sitios de inflamación. La eliminación de esta población a través de la manipulación de CD69, AICL, y/o LLT1, permitiría el control de los efectores que se derivan o son controlados por ellos. Estas nuevas posibles aproximaciones a través de los receptores de leucocitos inducibles CD69, AICL, y LLT1 se describen aquí.

40 Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un juego de planos en los cuales con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

45 Figura 1

Desarrollo exacerbado de AIC en ratones deficientes para CD69

50 A, Comparación de ratones control tratados con adyuvante completo de Freund (CFA) con imágenes representativas de los casos más severos de AIC en ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} (paneles centrales y a la derecha, respectivamente). B, incidencia de la artritis (expresada como porcentaje de ratones enfermos), y gravedad de la sintomatología clínica en ratones CD69^{+/+} (●), CD69^{+/+} (▲), y CD69^{-/-} (■), evaluada como se describe en el apartado de Métodos. Los resultados representan la media aritmética \pm desviación estándar (d.e.) de tres experimentos independientes (18 ratones/grupo/experimento). * $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test *t* de Student).

Figura 2

60 A, secciones representativas de la histopatología de las patas completas de ratones control (CFA, panel izquierdo, 100 \times), y ratones CD69^{+/+} (panel central, 100 \times) y CD69^{-/-} (panel derecho, 60 \times) inmunizados con CII. Las cabezas de flecha señalan las erosiones en cartílago y hueso, y las flechas completas los infiltrados de leucocitos y el pannus. B, evaluación de la inflamación, daño en cartílagos, formación de pannus articular y erosión ósea en las patas delanteras de ratones CD69^{+/+} (□) y CD69^{-/-} (■), como se describe en la sección Métodos. Los resultados corresponden a la media aritmética \pm d.e. del porcentaje de articulaciones circunscritas a cada grupo de severidad en tres experimentos independientes (8 ratones/grupo/experimento). * $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test U de Mann-Whitney).

Figura 3

Aumento de la respuesta inmune específica contra CII en ratones CD69^{-/-}

- 5 A, comparación del mayor tamaño de los bazo de los ratones CD69^{-/-} respecto a los ratones CD69^{+/+}. Barra horizontal = 1 cm. B, peso de los bazo y número de células (media aritmética \pm d.e.) de ratones control (tratados con CFA) y CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare) inmunizados con CII (AIC). * $P < 0.01$, comparado con ratones control inmunizados (test t de Student). C, proliferación de células de bazo (Sp) y nódulo linfóide (LN) de ratones CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare) inmunizados con CII, estimulados con distintas concentraciones de CII inactivado (eje x). Los datos reflejan la media aritmética \pm d.e. de incorporación de ³H-TdR en tres experimentos independientes. *, $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test U de Mann-Whitney). D, incremento de los isotipos dependientes de la respuesta Th1 específicos contra CII en ratones CD69^{-/-}. Niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2b (dilución 1/20000 del suero), IgG2c e IgG3 (dilución 1/5000), IgM e IgA (dilución 1/200) en sueros de ratones control (CFA) o CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare) inmunizados con CII en el momento del sacrificio (día 50). Los datos corresponden a la media aritmética d.e. de las unidades de absorbancia a 495 nm en tres experimentos independientes (10 ratones/grupo/experimento). * $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test t de Student).

Figura 4

- 20 *Análisis local de mRNA para citocinas en ratones CD69^{-/-} inmunizados con CII*

Análisis del mRNA de las patas traseras de ratones CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare). Cada carril corresponde al homogeneizado de mRNA de 6 ratones por grupo, y cada barra representa experimentos similares (6 ratones/grupo/experimento). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densitometría tomando como referencia la expresión de L-32 en cada muestra (media aritmética \pm d.e. de cuatro experimentos independientes). * $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test U de Mann-Whitney).

Figura 5

- 30 *Análisis local de citoquinas en extremidades y leucocitos sinoviales de ratones CD69^{-/-} inmunizados con CII*

A, Análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real de los mRNA de las patas traseras de ratones CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare). Cada barra representa la media aritmética \pm d.e. de 12 ratones por grupo en dos experimentos independientes. Los resultados para cada citocina están normalizados con respecto a la expresión de GAPDH en cada muestra. * $P < 0.01$ vs. anticuerpo control (test U de Mann-Whitney). B, Niveles de TGF- β 1 total y activo, IL-1 β , TNF- α y RANTES en lavados sinoviales de ratones CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare) en los que se ha inducido AIC. Los datos corresponden a la media aritmética \pm d.e. de tres experimentos independientes (6 ratones/grupo/experimento). * $P < 0.01$ vs. CD69^{+/+} (test U de Mann-Whitney). C, análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real de los mRNA de subgrupos purificados de células sinoviales de ratones CD69^{+/+} (\square) y CD69^{-/-} (\blacksquare). Cada barra representa la media aritmética \pm d.e. de 12 ratones por grupo en dos experimentos independientes. Los resultados para cada citocina están normalizados con respecto a la expresión de GAPDH en cada muestra. * $P < 0.01$ vs. anticuerpo control (test U de Mann-Whitney).

Figura 6

- 45 *Efecto de un anticuerpo bloqueante 25 del TGF- β en ratones control y deficientes para CD69*

A, panel izquierdo: Los ratones CD69^{+/+} se trataron con el anticuerpo bloqueante anti-TGF- β (\blacksquare), un control de isotipo IgG1 (\blacktriangle) o portador (\blacktriangledown) desde el 30 día 21 (segunda inmunización con CII) hasta el momento de medida. La inflamación de la pata se midió con un calibrador de precisión y se expresa como los mm de inflamación con respecto al día 21. Los resultados se representan como la media aritmética \pm d.e. de 12 ratones por grupo en dos experimentos independientes. Panel derecho: análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real de los mRNA de las patas de los ratones tratados con un control de isotipo (\square) o con anti-TGF- β (\blacksquare). Cada barra representa la media aritmética \pm d.e. de 12 ratones por grupo en dos experimentos independientes. Los resultados para cada citocina están normalizados con respecto a la expresión de GAPDH en cada muestra. * $P < 0.01$ vs. anticuerpo control (test U de Mann-Whitney). B, se trataron a los ratones CD69^{-/-} como se ha indicado en A y se determinó la inflamación de la pata (panel izquierdo) y el mRNA (panel derecho) como se ha descrito previamente.

Figura 7

- 60 *La activación de CD69 induce secreción de TGF- β en esplenocitos y leucocitos sinoviales de ratón con AIC*

A, se estudió la expresión de CD69 (línea gruesa, panel izquierdo) en esplenocitos estimulados con concanavalina-A. También se representa un control de isotipo (línea fina, panel izquierdo). Los esplenocitos se purificaron en distintos subgrupos y se trataron con un anticuerpo contra CD69 de ratón (\blacksquare) o un control de isotipo (\square), incubándose posteriormente con un entrecruzador. Se determinaron los niveles totales y activos de TGF- β (paneles a la derecha). B, se determinó la expresión de CD11b y CD69 (panel central), o controles de isotipo (panel izquierdo) en células sinoviales de ratón con AIC, que posteriormente se trataron como en A y se determinaron los niveles totales y activos de

TGF- β (paneles a la derecha). Los resultados en A y B se expresan como la media aritmética + SD de cuatro experimentos independientes. *, $p < 0.01$ versus anticuerpo control (test U de Mann Whitney).

Figura 8

El entrecruzamiento de CD69 induce producción de TGF- β en leucocitos sinoviales humanos y en transfectantes estables de células T humanas

A, se estudió la expresión de CD69 (línea gruesa, panel izquierdo) en leucocitos sinoviales humanos de pacientes con artritis reumatoide. También se representa un control de isotipo (línea fina, panel izquierdo). Estas células se trataron con un anticuerpo contra CD69 (TP 1/8) (■) o un control de isotipo (□) en la presencia (XL) o ausencia (-) de un anticuerpo secundario entrecruzador, y se determinaron los niveles de TGF- β total y activo (panel derecho). * $P < 0.01$ vs. anticuerpo control (test U de Mann-Whitney). Estos datos son representativos de resultados similares obtenidos con leucocitos sinoviales de pacientes con artritis reactiva o espondilitis anquilosante. B. La línea leucémica T humana Jurkat (línea fina, panel izquierdo), y transfectantes estables de CD69 en esta línea (línea gruesa, panel izquierdo) se tiñeron para CD69. El entrecruzamiento de CD69 media la producción de TGF- β 1, pero no de TNF (panel derecho). La línea linfoblastoide T Jurkat (JK) (□) y el transfectante estable que expresa CD69 (JK-CD69) (■) se trataron durante 24 horas con anticuerpo anti-CD69 entrecruzado. Los resultados en A y B se expresan como la media aritmética \pm SD de cuatro experimentos independientes. *, $p < 0.01$ respecto a la línea celular parental JK (test U de Mann-Whitney).

Figura 9

Actividad antitumoral aumentada en los ratones CD69^{-/-}

Se inyectaron 10^4 células tumorales RMA-S (A) o RMA (C) intraperitonealmente. Se estimó el crecimiento tumoral mediante monitorización diaria del peso corporal y el desarrollo de líquido ascítico. Se observaron resultados similares cuando se inyectaron subcutáneamente (B) 10^5 células RMA-S (A, $n=9$; B, $n=6$; C, $n=9$). (D) Se eliminaron las células NK y linfocitos T de los ratones CD69^{-/-} antes de la inoculación intraperitoneal de 10^4 células RMA-S. El tratamiento de eliminación de células NK se llevó a cabo por inyección de diluyente control o 100 μ l/inyección de un antisuero anti-Asialo GM1 a días -1 (antes de la inyección de las células tumorales) y a días +2 y +4 tras la inoculación de las células tumorales ($n=7$). El tratamiento de eliminación de los linfocitos T se llevó a cabo por inyección de un control de isotipo o 100 μ l/inyección de un anticuerpo anti-CD4 (GK1.5) a días -1 (antes de la inyección de las células tumorales) y a días +2 y +4 tras la inoculación de las células tumorales ($n=7$). Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes. Los símbolos huecos corresponden a ratones control CD69^{+/+} y los símbolos rellenos a ratones CD69^{-/-}. (E) Fotografías de los pulmones de ratones control y CD69^{-/-} dos semanas tras la administración de 10^4 células RM-1 por vía intravenosa (parte superior). Se muestra un ratón representativo de 10 por grupo. Se determinó el número de metástasis pulmonares y cada símbolo representa un ratón individual. Los símbolos huecos corresponden a ratones control CD69^{+/+} y los símbolos rellenos a ratones CD69^{-/-}. Se muestran resultados correspondientes a dos experimentos independientes.

Figura 10

Respuesta antitumoral exacerbada en ratones RAG-deficientes

Se inocularon intraperitonealmente 10^6 células RMA-S. Tras 72h, se examinaron las células peritoneales sin fraccionar de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-}-RAG2^{-/-} (A, B). (A) Perfiles de citometría de flujo (análisis de tamaño vs. complejidad). Se muestra un ratón representativo de 10/grupo. (B) Perfiles de comparación obtenidos mediante un contador de células Coulter Multisizer. Los resultados mostrados corresponden a dos experimentos independientes ($n=8$).

Figura 11

Aumento en la citotoxicidad y el reclutamiento linfocitario en los ratones CD69^{-/-}

Se inocularon intraperitonealmente 10^4 células RMA-S (A) o RM-1 (B). Tras 72 h, se examinaron las células peritoneales sin fraccionar de ratones CD69^{+/+} y CD69^{-/-} (A, B) y se valoró la citotoxicidad con respecto a células diana YAC. Se emplearon dos animales por grupo experimental (media aritmética \pm d.e). Los resultados representan tres experimentos realizados de manera idéntica. Los símbolos huecos corresponden a células NK purificadas de ratones control CD69^{+/+} y los símbolos rellenos a ratones CD69^{-/-}. (C, D, E) Acumulación esplénica y peritoneal de linfocitos en ratones CD69^{-/-} en respuesta a células tumorales. Se inocularon 10^5 células RM-1 o tan solo PBS ($n=7$ /grupo). Se recogieron los lavados peritoneales tras 3 o 6 días, y se determinaron los números totales de leucocitos ($\times 10^{-6}$). (C) Se analizaron las células recogidas de los lavados en un contador de células Coulter Multisizer, y se compararon los perfiles a los tiempos indicados tras la inoculación del tumor. Perfiles de comparación obtenidos mediante un contador de células Coulter Multisizer. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes en los que se emplearon 2/2, 2/2 y 4/4, ratones control (línea discontinua) / ratones CD69^{-/-} (línea continua). (E) Comparación del mayor tamaño de los bazo de los ratones CD69^{-/-} y control (8 semanas de edad) tres días después de la inoculación intraperitoneal de 10^5 células RM-1. Se muestran bazo representativos de diversos experimentos independientes.

Figura 12

Atenuación de la muerte celular espontánea en los linfocitos de los ratones CD69^{-/-}

- 5 Las células peritoneales de ratones sin tratamiento (A) se pusieron en cultivo en medio y se determinó la supervivencia celular por tinción con yoduro de propidio (IP). Los datos representan el porcentaje de células IP⁺ (media aritmética \pm d.e.). (B, C) Análisis de la actividad caspasa-3 intracelular de células de bazo (B) y NK purificadas (C) de ratones CD69^{+/+} (panel izquierdo) y CD69^{-/-} (panel derecho) tras tres días post-inoculación de 10⁵ células RM-1. La activación de caspasa-3 se determinó mediante el empleo del sustrato fluorogénico PhiPhiLux-G1D2. Se representa la tinción de PhiPhiLux en FL-1 vs. tamaño celular. Los datos corresponden a un experimento (n=6).

Figura 13

Expresión de citocinas en ratones CD69^{-/-}

- 15 (A) Niveles relativos de mRNA de citocinas y quimiocinas en células peritoneales tras tres días post-inoculación intraperitoneal de 10⁵ células RM-1. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densitometría normalizadas con respecto a la expresión de GAPDH o L32 en cada muestra. Se emplearon cinco animales por grupo experimental, y los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes. (B) Niveles de la quimiocina MCP-1 en células peritoneales procedentes de ratones control y CD69^{-/-} tratados con tioglicolato, y estimuladas con LPS. Los datos corresponden a la media aritmética \pm d.e. (n=4/grupo) de un experimento representativo de tres realizados. * $P < 0.004$.

Figura 14

- 25 *Aumento de la respuesta antitumoral en ratones normales por bloqueo del TGF- β*

- Perfil de supervivencia de ratones control y CD69^{-/-} a los que se han inyectado 10⁴ células RMA-S (día 0) y se han tratado con el anticuerpo anti-TGF- β 1D11 (500 μ g/inoculación) o PBS a días -3, -1 (antes de la inoculación de las células tumorales), y +1, manteniéndose el tratamiento una vez a la semana tras la inoculación del tumor (n=4). Los resultados corresponden a dos experimentos independientes.

Figura 15

La activación de CD69 induce TGF- β 1

- 35 Se sembraron células T CD3⁺ sin estimular sobre anti-CD3 inmovilizado placas de 96 pocillos. (A) Expresión de CD69 tras la activación con anti-CD3 durante 24h, determinada por citometría de flujo mediante un anticuerpo contra CD69 de ratón conjugado con FITC (línea gruesa). La línea punteada corresponde al control de isotipo. (B) Se trataron linfocitos T purificados de ratón resuspendidos en medio sin suero durante 72h con el anticuerpo anti-CD69 2.2 o un control de isotipo (IgG1) y un suero de cabra contra IgG de ratón (entrecruzador). Donde se indica, se trataron las células con el inhibidor PD98059. Posteriormente, se determinó la secreción de TGF- β por ELISA. Los datos representan la media aritmética \pm d.e. de pocillos por duplicado y tres experimentos independientes. (C) Se determinó la mortalidad celular mediante tinción con azul tripano tras 48 h de cultivo. Los datos representan la media aritmética \pm d.e. de pocillos por triplicado. (D) Activación de Erk-1 y Erk-2 por CD69. Se trataron a 4°C linfocitos T de ratón preactivados con anti-CD3 con un anticuerpo anti-CD69 o un control de isotipo y se lisaron tras 5, 10, 15, 25 y 60 min de incubación a 37°C con un anticuerpo entrecruzador. Los lisados se sometieron a PAGE/SDS, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se realizaron experimentos de Western blot con un anticuerpo policlonal que reconoce Erk-1 y Erk-2 fosforilados (panel superior). Panel inferior, niveles totales de Erk determinados por Western blot con un anticuerpo monoclonal contra Erk. La posición relativa de Erk-1 y Erk-2 se denota mediante flechas. También se recogen los niveles relativos de fosforilación de Erk-1 y Erk-2 con respecto a los niveles totales de Erk en unidades arbitrarias de densitometría. Se muestran ratones CD69^{+/+} (□) y CD69^{-/-} (■).

Figura 16

- 55 *Actividad terapéutica antitumoral de los anticuerpos contra CD69 en ratones normales y deficientes para RAG*

- Perfiles de supervivencia de ratones control y SCID tratados con anticuerpos contra CD69 o controles de isotipo. Se inocularon intraperitonealmente 10⁴ células RMA-S en ratones control (A, B) o 10⁶ células en ratones SCID. (C) Se trataron los ratones como se ha indicado anteriormente con anti-CD69 o control de isotipo (A, B, C) y se observó a diario el crecimiento de tumores (hasta 20 semanas post-inoculación) mediante la monitorización del peso corporal y el desarrollo de líquido ascítico (A, n=9; B, n=6; C, n=9). Los resultados corresponden a dos experimentos independientes.

Figura 17

- 65 *Los anticuerpos contra CD69 afectan a la fase temprana del crecimiento de tumores en el peritoneo*

Se examinaron las células peritoneales de ratones control (A) o RAG1^{-/-} tres días después de la inyección intrape-

ritoneal de 10^6 células RMA-S. Los ratones se trataron un día antes de la inoculación de las células tumorales con 500 μg /ratón de un anticuerpo contra CD69 (línea sólida) o un control de isotipo (línea discontinua). Las células recogidas del lavado peritoneal se analizaron mediante un contador de células Coulter Multisizer y se compararon los perfiles obtenidos ($n=8/\text{grupo}$). Los datos corresponden a dos experimentos independientes.

Figura 18

Respuesta de anticuerpos a DNP-KLH en ratones WT y deficientes para CD69

Se inmunizó con 100 μg de DNP-KLH por ratón a días 0 (inmunización primaria) y día 21 (inmunización secundaria) s.c. en la base de la cola o i.p., usando o Alum o CFA como adyuvantes. Los ratones se sangraron a día 7 (a), y a día 28 (b). (a) niveles de IgM en la inmunización primaria (dilución de suero 1:2000). (b) niveles de IgM (1:2000), IgG1 (1:20000), IgG2c (1:10000), IgG2b (1:10000), e IgG3 (1:10000) en la inmunización secundaria. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm d.e. de 4 ratones/grupo/experimento analizados en dos experimentos independientes. *, $p<0.01$ respecto al mismo tratamiento en ratones WT (test de la U de Mann-Whitney).

Figura 19

Anti-CD69 2.2 disminuye la expresión de CD69 en timocitos

Timocitos de ratones DBA/1 tratados (panel derecho) o no con anticuerpo anti-CD69 2.2 *in vivo* fueron aislados y teñidos para citometría con el anticuerpo anti-CD69 de ratón H1.2F3 marcado con FITC y un anticuerpo frente a CD3 marcado con APC. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados.

Figura 20

Efecto del tratamiento con anti-CD69 2.2 en la AIC

Los ratones DBA/1 se trataron a días 20 y 28 con el anticuerpo anti-CD69 bloqueante 2.2 (\blacktriangle) o con un anticuerpo control de isotipo (\blacksquare). La inflamación de la pata se midió con un calibre de precisión y se expresa como mm de inflamación respecto al día 21. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm SD de 12 ratones/grupo en dos experimentos independientes. *, $p<0.01$ vs anticuerpo control (test U de Mann Whitney).

Figura 21

El anti-CD69 2.3 elimina los timocitos que expresan CD69

Los timocitos de los ratones DBA/1 tratados (panel derecho) o no (panel izquierdo) con anti-CD69 2.3 se aislaron y tiñeron para citometría de flujo con el anticuerpo anti-CD69 de ratón H1.2F3 marcado con FITC y un anticuerpo frente a CD3 marcado con APC. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados.

Figura 22

Efecto del tratamiento con el anti-CD69 2.3 en AIC

Los ratones DBA/1 se trataron a días 20 y 28 con el anticuerpo eliminador anti-CD69 2.3 (\blacktriangle) o con el control de isotipo IgG2a (\blacksquare). La inflamación de la pata se midió con un calibre de precisión y se expresa como mm de inflamación respecto al día 21. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm SD de 12 ratones/grupo en dos experimentos independientes. *, $p<0.01$ vs anticuerpo control (test U de Mann Whitney).

Realizaciones preferentes de la invención

En esta patente se demuestra el papel inhibitor de CD69 en las reacciones inmunes, empleando un modelo experimental de artritis murina inducida por colágeno (AIC). Los ratones deficientes para CD69 desarrollan una mayor incidencia y gravedad de la AIC, con incremento de las respuestas inmunitarias T y B contra colágeno de tipo II (CII). TGF β 1 y TGF β 2, que tienen una función protectora en la AIC, mostraban niveles reducidos en los focos inflamatorios de los ratones CD69 $^{-/-}$, correlacionando con un aumento en las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y RANTES. En este sentido, la inyección local de un anticuerpo neutralizante contra TGF- β en ratones normales en los que se ha inducido AIC también incrementa la gravedad de la misma, así como los niveles de las citoquinas proinflamatorias en ratones CD69 $^{+/+}$, pero no en ratones CD69 $^{-/-}$. Además, la activación de CD69 induce la producción de TGF- β total y activo en linfocitos T activados, células sinoviales de ratón o células mononucleadas de sinovios de artropatías crónicas humanas, que expresan CD69, y en transfectantes estables de la línea T Jurkat para CD69 humano, pero no en la línea parental CD69 negativa. Así, CD69 es un modulador negativo de la reactividad autoinmune y de la inflamación a través de la síntesis de TGF β , una citoquina que, a su vez, disminuye la producción de diferentes mediadores proinflamatorios.

También se demuestra el papel inhibitor de CD69 *in vivo* mediante el análisis de la susceptibilidad de los ratones deficientes para CD69 a la inducción de tumores. Los ratones deficientes en CD69 en los que se han desarrollado

tumores exhibieron una fuerte regresión del crecimiento tumoral y aumento de la supervivencia comparado con ratones normales. Esta potente respuesta antitumoral correlaciona con una producción deficiente de TGF- β , un incremento en los niveles de citocinas inflamatorias y la quimiocina MCP-1, y está asociado con un aumento en el reclutamiento de linfocitos efectores y disminución de la apoptosis celular. Esta resistencia frente al crecimiento tumoral depende de los linfocitos T y las células NK, y persiste en ratones inmunodeficientes CD69^{-/-} RAG1^{-/-}. En consonancia con estos resultados, el bloqueo del TGF- β en ratones control aumenta la respuesta antitumoral, estableciendo una relación directa entre la disminución de la síntesis de TGF- β encontrada en los ratones CD69^{-/-} y la mejora en la respuesta antitumoral. Por otra parte, la activación de CD69 induce la activación de la quinasa ERK y la producción de TGF- β por los linfocitos T. El bloqueo farmacológico de ERK mediante el inhibidor PD98059 inhibe la producción de TGF- β , demostrando la importancia de la señalización mediada por CD69 en la regulación del TGF- β .

En esta patente también se demuestra que el tratamiento *in vivo* de ratones normales e inmunodeficientes (cepas SCID y RAG-negativa) con el anticuerpo antagonista de CD69 2.2 aumenta la respuesta antitumoral. Por lo tanto, demostramos que el tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-CD69 es una nueva aproximación para la potenciación de la respuesta inmunitaria en la manipulación de la inmunidad tumoral que se puede ampliar a enfermedades infecciosas y síndromes de inmunodeficiencias para recuperar la respuesta inmunitaria. El tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-CD69 causa diferentes efectos dependiendo del anticuerpo: el antagonista 2.2 aumenta la respuesta inmunitaria incrementando la gravedad de la AIC y el rechazo tumoral, mientras que el deplecionante 2.3 elimina los leucocitos efectores activados CD69⁺, lo que causa una atenuación de la AIC. Además, se puede emplear este reactivo en la eliminación directa de tumores que sean CD69⁺.

Como CD69, AICL y LLT1 se expresan a bajos niveles en leucocitos y son inducidos fuerte y transitoriamente. Por tanto, AICL y LLT1, como CD69, puede que regulen la liberación de TGF- β por los leucocitos.

El papel de las moléculas de activación temprana como moduladores negativos de la respuesta inmunitaria introduce la posibilidad de emplear estas moléculas como dianas en la terapia de la inflamación crónica y otras enfermedades inmunitarias. Dado que CD69, AICL y LLT1 se expresan exclusivamente en leucocitos activados que infiltran tejidos inflamados, la estimulación farmacológica de la síntesis de TGF- β a través de CD69, AICL y LLT1 puede tener un efecto local, evitando, por tanto, los efectos negativos del incremento sistémico de TGF- β .

La patente presentada contiene procedimientos para la modulación de la respuesta inmune a través del empleo de CD69, AICL y LLT1 como dianas mediante diversos protocolos.

Una meta específica consiste en la modulación de la respuesta inmunitaria a través de una molécula de activación temprana usando sustancias que inhiben o bloquean la señalización a través de dicha molécula de activación temprana, incluyendo aquéllas que inhiben la expresión de la molécula, bloquean la unión de la molécula de activación temprana a sus receptores o ligandos, o reducen la expresión en la superficie celular del polipéptido de activación temprana, y que se identifican como *antagonistas de la molécula de activación temprana*. El tercer objetivo es la regulación inmunitaria a través de la erradicación de las células que expresan la molécula de activación temprana, empleando sustancias que eliminan células positivas para CD69, AICL y/o LLT1, y que se identifican como *eliminadores de la molécula de activación temprana*.

Otros objetivos específicos de esta patente están constituidos por los métodos para descubrir, identificar o evaluar sustancias que son antagonistas o eliminadores de células positivas para CD69, AICL y/o LLT1. Estos métodos incluyen medida del calcio intracelular, activación de MAPK, producción de TGF- β , inducción de mediadores de apoptosis y lisis celular. Algunas de estas sustancias se identifican específicamente, como las moléculas de anticuerpo contra los polipéptidos de activación temprana o sustancias directa o indirectamente derivadas de los mismos. También son objeto de esta patente el/los ligando/s o receptor/es putativo/s de estas moléculas de activación temprana identificados mediante el empleo de cromatografía de afinidad usando como sustrato construcciones relacionadas con la molécula de activación temprana, o aquellos cuya actividad antagonista o eliminadora en la molécula de activación temprana se identifique por cualquiera de los métodos indicados en esta invención.

Otro punto específico de esta patente es el empleo de sustancias que pueden modular la respuesta inmunitaria directa o indirectamente a través de una molécula de activación temprana en el tratamiento de enfermedades inmunes. Como se muestra en los ejemplos, los procesos autoinmunes o tumorales están influidos por la presencia o ausencia de moléculas de activación temprana, y el tratamiento con sustancias que actúan a través de dicho receptores. Estos resultados se pueden usar para tratar otras enfermedades mediadas por el sistema inmune, como:

- Enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide y otros tipos de artritis o artropatías crónicas o agudas con componente inmunitario, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune, tiroiditis, y otras enfermedades inmunitarias específicas de tejido, como soriasis. También se contemplan en este grupo diversas enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple, miastenia gravis, etc., y gastrointestinales, como son la enfermedad de Crohn, colitis, síndrome celíaco, hepatitis y otras enfermedades mediadas por el sistema inmune.
- Enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, cardiomiopatías, fiebres reumáticas, endocarditis, vasculitis, y otras enfermedades cardiovasculares con componente inmune.

- Enfermedades respiratorias, como enfisema, infecciones de las vías aéreas, y otras.
- Procesos alérgicos y reacciones de hipersensibilidad (tipos I, II, III y IV), incluyendo asma, rinitis, y otras reacciones de este tipo con componente inmunitario.
- Trasplante o rechazo de injertos, que comprende trasplante de órganos, injertos de tejido, y transfusiones sanguíneas. También se incluye la enfermedad de injerto vs. huésped durante el trasplante de médula ósea.
- Enfermedades oncológicas, como leucemia, desórdenes linfoproliferativos, tumores sólidos y todos los tipos de cáncer.
- Enfermedades infecciosas, incluyendo aquéllas producidas por bacterias, virus, hongos o parásitos, shock séptico, y otras reacciones inmunopatológicas a agentes infecciosos.
- Enfermedades de inmunodeficiencia congénita y adquiridas, y síndromes de inmunodepresión por radioterapia y quimioterapia.
- Procesos degenerativos como neurodegeneración, que impliquen a células inmunocompetentes, como la microglía.
- Administración, control de antígeno, empleada para manipular la naturaleza de la respuesta antígeno-específica.
- Terapia génica.
- Algunos procesos mediados por el sistema inmune pueden potenciarse por la manipulación de una molécula de activación temprana, como la inmunosupresión, que se puede aplicar en varios contextos, incluyendo los previamente indicados, o inmunoactivadores que pueden emplearse en vacunación, así como la inmunidad de protección por inyección de DNA codificante para antígenos microbianos o tumorales, u otros procesos para el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmune, incluyendo las indicadas anteriormente.

Dado que el TGF- β y otros mediadores de la señalización por CD69, AICL y LLT1 tienen un efecto pleiotrópico, todas las enfermedades sugeridas previamente pueden dar cuenta del efecto descrito para estas moléculas de activación temprana en la regulación inmunitaria, y los objetivos específicos no se limitan a las siguientes predicciones, que están basadas en los ejemplos indicados a continuación: el efecto inmunosupresor del TGF- β podría ser útil para el tratamiento de enfermedades inmunitarias en las cuales la activación del sistema inmune esté exacerbada, como las enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes y otras de la lista previa. La aproximación empleando antagonistas seguiría un camino opuesto, siendo utilizada en el tratamiento de enfermedades o procesos que requieren de la potenciación del sistema inmune, como el rechazo de tumores, el tratamiento de infecciones, o su prevención mediante vacunación. La estrategia de eliminación erradicaría las células positivas para CD69, AICL y/o LLT1, que son aquéllas activadas localmente en respuesta a estimulación antigénica y median la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la consecuencia esperada sería la mejora de las enfermedades asociadas con la exacerbación de la respuesta inmune, como las enfermedades autoinmunes, el rechazo de trasplantes y otras de la lista anterior.

Polipéptidos de activación temprana

Los términos “proteínas de activación temprana” y “polipéptidos de activación temprana” se refiere a CD69, AICL, LLT1, y sus fragmentos. Los términos “proteína” y “polipéptido” son intercambiables.

CD69

Como se usa aquí, “CD69”, también conocida como proteína de “activación muy temprana”, “molécula de inducción de activación” y “gp34/28”, se refiere al CD69 de mamífero, preferiblemente a la proteína de CD69 humana. De acuerdo, el término “CD69 humano” se refiere a un polipéptido que tiene o es homólogo a (p.e., al menos sobre un 85%, 90%, 95% idéntico a) una secuencia de aminoácidos mostrada previamente SEQ ID NO 2 [Lopez-Cabrera, 1993 #208], o que es codificada por: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifique para CD69 humano (p.e., una secuencia de ácido nucleico que codifique para CD69 humano según SEQ ID NO 1 [Lopez-Cabrera, 1993 #208]; (b) una secuencia de ácido nucleico degenerada a una secuencia de CD69 humano natural; (c) un ácido nucleico de secuencia homóloga a (p.e., al menos sobre un 85%, 90%, 95% idéntico a) la secuencia de ácido nucleico para CD69 natural; o (d) una secuencia de ácido nucleico que hibride con alguno de las secuencias de ácido nucleico indicadas con anterioridad bajo condiciones astringentes, p.e., condiciones altamente astringentes. Un CD69 preferido es una variante o alelo natural de CD69.

Moléculas de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana

Una “molécula de anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana” es una molécula de anticuerpo que interacciona (p.e, se une a) polipéptido de activación temprana, preferiblemente a una proteína de activación temprana

humana. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana se unen al dominio extracelular del polipéptido de activación temprana (p.e., un epítipo del polipéptido de activación temprana localizado fuera de la célula). En algunos aspectos, la molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana puede ser una molécula de anticuerpo anti-CD69, p.e., una molécula de anticuerpo anti-CD69 humano. Ejemplos de anticuerpos monoclonales frente a CD69 humano incluyen, pero no se limitan a una molécula de anticuerpo anti-CD69 humano análoga al anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.2, una molécula de anticuerpo anti-CD69 humano análoga al anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.3 o un anticuerpo anti-CD69 humano, p.e., un anticuerpo anti-CD69 conocido en la bibliografía, que pueda actuar como antagonista o eliminador de CD69 o moléculas de anticuerpo que tienen epítopos que solapen con el epítipo de tal anticuerpo, o que compitan con tal anticuerpo para la unión. Ejemplos de anticuerpos anti-CD69 humano conocidos en la bibliografía incluyen: TP1/8, TP1/22, TP 1/28, TP 1/33, TP 1/55 (como se describe, p.e., en [Cebrian, 1988 #170]); CH/4, CH/1, CH/2, FAB/1 (como se describe, p.e., en [Sanchez-Mateos, 1991 #126]); L78, MLR3, FN61, FN50 (como se describe, p.e., en Schwarting, R. *et al.* (Eds) *Leukocyte Typing IV*, Springer-Verlag, New York, 1989, p. 428); MLR3 (como se describe, p.e., en [Corte, 1981]); EA-1 (como se describe, p.e., en Hara, T (1986) *J. Exp. Med.* 164:1988-2005); Leu 23 (como se describe, p.e., en [Lanier, 1988]); y C1.18, E16.5 (como se describe, p.e., en [Gerosa, 1991]). Ejemplos de moléculas de anticuerpo que se pueden usar en la invención incluyen pero no se limitan a: una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a, un epítipo que incluye uno o más residuos de la región cuello de un polipéptido de CD69 (p.e., uno o más residuos del 62-84 del CD69 humano); una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a uno o más residuos del dominio NK (o dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de un polipéptido de CD69 (p.e., uno o más residuos de los residuos 82 a 199 del CD69 humano); una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a, un epítipo que incluye uno o más residuos del dominio intracelular de un polipéptido de CD69 (p.e., uno o más residuos de 1-40 del CD69 humano); una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a un epítipo, al que cuando se une modula, p.e., aumenta o reduce, la interacción de las regiones de CD69 citoplásmico y/o transmembrana con un efector, cuya actividad puede determinarse por los métodos descritos aquí (p.e., producción de TGF- β , activación de MAPK, o señalización por Ca^{2+}); una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a, un epítipo (p.e., un epítipo conformacional o lineal), el cual se modula cuando el anticuerpo está unido, p.e., aumenta o reduce la formación de dímeros de CD69 (p.e., un epítipo que incluye el residuo Cys68 del CD69 humano o un residuo localizado cerca de la Cys68); una molécula de anticuerpo que pueda modular la expresión celular de CD69, p.e., una molécula de anticuerpo que module negativamente la expresión de CD69 en la membrana celular; una molécula de anticuerpo que puede modular la unión de un ligando o receptor de CD69, p.e., un anticuerpo que puede inhibir p.e., inhibir competitivamente, o potenciar la unión de un ligando o receptor a CD69; una molécula de anticuerpo que interacciona con, p.e., se une a, o que puede inhibir o potenciar la unión de un ligando o receptor a uno o más residuos de aminoácidos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188 del CD69 humano.

En un ejemplo, la molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana se une a todo o parte del epítipo de un anticuerpo descrito aquí, p.e., un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía, puede actuar como un antagonista o un eliminador, o un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana humano análogo a un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana de ratón, p.e., un anticuerpo anti-CD69 de ratón (p.e., anticuerpo 2.2, 2.3, o H1.2F3 (éste último descrito, p.e., en Yokoyama *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:369-376). Un anticuerpo anti-CD69 se puede unir a uno o más residuos de los epítopos descritos en [Sanchez-Mateos, 1991 #126] o competir por la unión a un anticuerpo que se une a uno de los epítopos descritos. La molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana puede inhibir, p.e., inhibir competitivamente, la unión de un anticuerpo descrito aquí, p.e., un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos frente a un polipéptido de activación temprana humano. Una molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana puede unirse a un epítipo, p.e., un epítipo conformacional o lineal, de manera que cuando interaccionen se prevenga la unión de uno de los anticuerpos descritos aquí, p.e., un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos frente a CD69 humano. El epítipo puede estar muy próximo o funcionalmente asociado, p.e., un epítipo solapante o adyacente en secuencia lineal o conformacionalmente, a uno de los reconocidos por un anticuerpo descrito aquí, p.e., un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos.

En un ejemplo preferido, la interacción, p.e., la unión, entre una molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana y un polipéptido de activación temprana ocurre con alta afinidad (p.e., constante de afinidad de al menos $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente, entre $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y 3×10^{10} , o sobre $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) y especificidad. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana modula la respuesta inmune, p.e., actúa como un antagonista o eliminador del polipéptido de activación temprana.

Como se usa aquí, "unión específica" se refiere a la propiedad del agente de unión, preferiblemente el anticuerpo, a: (1) unirse a un polipéptido de activación temprana, p.e., una proteína de polipéptido de activación temprana humano, con una afinidad de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y (2) preferentemente unirse al polipéptido de activación temprana, p.e., la proteína de polipéptido de activación temprana humano, con una afinidad que es al menos dos veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, o mayor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (p.e. BSA, caseína) distinto al polipéptido de activación temprana.

Como puede verse en el presente invento, muchos tipos de moléculas de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana, p.e., anticuerpos, o fragmentos de ellos que se unan al antígeno, son útiles en los métodos de esta invención. Las moléculas de anticuerpo pueden ser de varios isotipos, incluyendo: IgG (p.e., IgG1, IgG2 (p.e., IgG2a, IgG2b), IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, o IgE. Una molécula de anticuerpo preferida es un isotipo IgG. Las moléculas de

anticuerpo pueden ser de longitud completa (p.e., un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden incluir sólo un fragmento de unión al antígeno (p.e., un Fab, F(ab')₂, Fv o una cadena sencilla de un fragmento Fv). El anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo diseñada, p.e., un anticuerpo humanizado.

- 5 Los anticuerpos, u otros agentes descritos aquí, pueden ser evaluados por su capacidad para actuar como antagonistas o eliminadores de CD69.

10 Un anticuerpo eliminador de un polipéptido de activación temprana es uno que, tras administración a un animal, sólo o conjugado a una toxina, reduce el número absoluto de células positivas para el polipéptido de activación temprana, p.e., células tumorales CD69+, AICL+ y/o LLT1+, p.e., leucocitos CD69+, AICL+ y/o LLT1+ presentes en infiltrados inflamatorios crónicos. Usualmente, actuará a través de la lisis directa de estas células (en contraste con, p.e., una retención transitoria de células en un compartimento orgánico, tal como la médula ósea o el hígado).

15 Un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana antagonista es uno que, tras administración al animal, induce a las células CD69+ a disminuir su producción de la citoquina TGF- β , p.e., por el bloqueo de la señalización endógena inducida por la unión de CD69 a uno o más de sus ligandos naturales o receptores; (p.e., por el bloqueo de la interacción de CD69 con sus ligandos naturales o receptores) a los que nos referimos aquí como “un antagonista bloqueante”. Otros antagonistas de polipéptidos de activación temprana incluyen, p.e., “un antagonista que reduzca la expresión”, que disminuye el nivel de expresión del polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula, 20 p.e., por la unión a un polipéptido de activación y la internalización de dicho polipéptido.

Varios métodos *in vitro* se pueden usar, p.e., en conjunción con los ensayos *in vivo* en el animal completo, para evaluar la capacidad de candidatos para su actividad como deplecionantes o antagonistas. Un ensayo *in vitro* puede no ser indicativo de su actividad *in vivo* en todos los casos, pero puede ser útil en estrategias de búsqueda.

25 *Eliminadores de las moléculas de activación temprana*

Un anticuerpo eliminador de un polipéptido de activación temprana *in vitro* es un anticuerpo que, tras la incubación con células que expresan el polipéptido de activación temprana, reduce el número absoluto de tales células. Esto 30 puede realizarse a través de la lisis directa, p.e., vía mecanismos dependientes de complemento, de receptor Fc o de toxinas conjugadas. Así, un eliminador de un polipéptido de activación temprana puede lisar células que expresen el polipéptido de activación temprana en ensayos de muerte *in vitro*. El isotipo del anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana puede desempeñar un papel importante en la posible función como eliminador, vía un mecanismo basado en complemento. Si un anticuerpo es capaz de unirse a complemento, se comportará probablemente como un 35 eliminador. La mayoría de anticuerpos naturales tienen una gran afinidad por complemento y serán así eliminadores. Esto es menos probable en el caso de la IgG1 de ratón y la IgG4 humana, que tienen baja afinidad por complemento. Además, los anticuerpos pueden ser diseñados para reducir o aumentar su afinidad por complemento. Un anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana de ratón (generado en ratón u otra especie) puede matar células de ratón que expresan el polipéptido de activación temprana *in vitro* en presencia de complemento. Células diana que expresen los 40 polipéptidos de activación temprana útiles para probar tales anticuerpos incluyen, p.e., las leucemias murinas, e.g., el timoma murino EL-4, para CD69. Por ejemplo, un anticuerpo generado en ratón u otra especie frente a CD69 humano que sea eliminador, puede matar células humanas que expresan CD69, p.e., linfocitos T de fluido sinovial de artritis reumatoide que expresan CD69, leucemias que expresan CD69, o transfectantes estables de CD69, p.e., células de la leucemia linfoblástica Jurkat transfectadas establemente para expresar CD69. Este anticuerpo no matará (o lo hará a un 45 nivel mucho menor) células control que no expresan CD69, p.e., la línea parental Jurkat no transfectada, que no expresa CD69. Así, la capacidad de un anticuerpo para funcionar como eliminador puede ser ensayada *in vitro* por su capacidad para lisar células diana que expresan el polipéptido de activación temprana y células control que no expresan dicho receptor. Un candidato para eliminador, lisará las células positivas para el polipéptido de activación temprana pero no las células control que no expresan el polipéptido de activación temprana (o las lisará significativamente menos). En 50 un ejemplo, la lisis celular puede monitorizarse en un ensayo en que las células diana (y control) se marcan con ⁵¹Cr y se incuban con el anticuerpo en presencia de complemento de conejo, típicamente 2 h a 37°C. Tras ello se recupera el sobrenadante y el nivel de lisis celular se evalúa por la cantidad de ⁵¹Cr liberada al sobrenadante. El nivel de lisis es indicado por la liberación de ⁵¹Cr por las células lisadas.

55 *Antagonistas anti-molécula de activación temprana*

Un anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana antagonista *in vitro* es el que, tras incubación con células CD69+ disminuye su producción de la citoquina TGF- β , p.e., por bloqueo de la señalización endógena inducida por la unión de CD69 a uno o más de sus ligandos naturales o receptores, presentes en el sistema de cultivo *in vitro*. 60 Así, uno puede realizar una búsqueda de antagonistas *in vitro* incubando un candidato antagonista con una célula que expresa el polipéptido de activación temprana y evaluando su efecto en la producción de TGF- β , p.e., comparado con una célula control, p.e., una célula que no expresa el polipéptido de activación temprana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 de ratón puede ser evaluado en su capacidad para comportarse como un antagonista *in vitro* analizando su capacidad para inhibir o reducir la producción de TGF- β por esplenocitos activados con concanavalina A, que 65 son CD69+. Un anticuerpo anti-CD69 humano puede ser evaluado por su capacidad para mediar la producción de TGF- β por células Jurkat transfectadas establemente con CD69. Un antagonista inhibirá la producción de TGF- β por las células que expresan el polipéptido de activación temprana, pero no en una línea control, preferiblemente la línea parental que no expresa el polipéptido de activación temprana. Un antagonista *in vitro* puede ser también un

antagonista que disminuya la expresión de la molécula de activación temprana, p.e., un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana antagonista que disminuya la expresión en membrana del antígeno frente al que va dirigido. Un antagonista *in vitro* puede ser detectado por la incubación del antagonista candidato con una célula que exprese la proteína de activación temprana y evaluando si esta proteína de activación temprana disminuye su expresión o incluso desaparece de la superficie celular. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón anti-polipéptido de activación temprana puede ser evaluado por su capacidad para disminuir la expresión de un polipéptido de activación temprana usando un reactivo capaz de detectar la presencia del anticuerpo anti-molécula de activación temprana de ratón, p.e., un reactivo anti-ratón policlonal. Si el reactivo no detecta al candidato en la superficie celular, entonces el antagonista puede identificarse como un antagonista que reduce la expresión de la molécula de activación temprana en la membrana de la célula. Un antagonista no debería actuar como eliminador.

Además, un antagonista puede tener una o más de las siguientes propiedades:

- 1) bloquear la unión del polipéptido de activación temprana puro a su receptor o ligando purificados, o a preparaciones parcialmente purificadas de fracciones de membrana de células que respondan a el polipéptido de activación temprana, p.e., que expresen un receptor para un polipéptido de activación temprana, o a células enteras que respondan al polipéptido de activación temprana, p.e., que expresen un receptor de un polipéptido de activación temprana;
- 2) bloquear la unión de una célula que exprese el polipéptido de activación temprana al receptor del polipéptido de activación temprana purificado;
- 3) bloquear la unión de una célula que expresa el polipéptido de activación temprana a una célula que exprese el receptor del polipéptido de activación temprana (p.e., células que respondan al polipéptido de activación temprana) o a preparaciones parcialmente purificadas de tales fracciones de membrana de células que respondan al polipéptido de activación temprana, p.e., que expresen un receptor para el polipéptido de activación temprana. p.e., el candidato antagonista bloquearía la unión de una molécula ligando de CD69 a un transfectante estable de CD69 humano de las células Jurkat (pero no a la línea parental CD69-);
- 4) bloquear la unión de un anticuerpo monoclonal agonista a una célula que expresa el polipéptido de activación temprana y así inhibir la producción de TGF- β por el anticuerpo agonista.
- 5) Disminuir los niveles de un polipéptido de activación temprana en la superficie de la célula, p.e., por la unión a un polipéptido de activación temprana y la internalización del polipéptido.

Moléculas de anticuerpo

Como se usa aquí, el término molécula de anticuerpo, se refiere a una molécula que incluye un número suficiente de regiones determinantes de complementariedad (CDRs), preferiblemente 6, presentadas en una disposición que permite la unión de las CDRs al antígeno conocido. Así, el término incluye anticuerpos completos (incluyendo los anticuerpos naturales y los diseñados por Biología Molecular), y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos naturales o diseñados. El término incluye varios tipos de anticuerpos o moléculas de anticuerpo, incluyendo los monoespecíficos, monoclonales, recombinantes, humanos, no humanos, p.e., murinos. También se incluyen anticuerpos de cadena sencilla, intracuerpos y anticuerpos bivalentes. También se incluyen moléculas de anticuerpo quiméricas, con un CDR distinto injertado, humanizados, desimmunogénicos, así como otras que hayan sido diseñadas para reducir la inmunogenicidad, p.e., aquellos con CDRs derivados de una fuente no humana, p.e., de un animal no humano como el ratón, y/o derivados de la generación parcial o totalmente al azar de secuencias, p.e., usando un método de selección en fagos. Tales fragmentos no humanos pueden ser insertados en moléculas humanas, humanizadas, o en otras disposiciones que las hagan menos antigénicas cuando se administren a un humano.

Así, una molécula de anticuerpo puede tener: CDRs de una fuente no humana, p.e., de un anticuerpo no humano, p.e., de una inmunoglobulina de ratón u otra inmunoglobulina no humana, de una secuencia consenso, o de una secuencia generada por selección de fagos, o cualquier otro método para generar diversidad; y teniendo una disposición que es menos antigénica en una estructura humana que no humana, p.e., en el caso de CDRs de una inmunoglobulina no humana, menos antigénico que la estructura no humana de la cual los CDRs no humanos se tomaron. La estructura de la inmunoglobulina puede, p.e., ser humana, no humana humanizada, p.e., un ratón, estructura modificada para reducir la antigenicidad en humanos, o una estructura sintética, p.e., una secuencia consenso o de un método de generación de diversidad *in vitro*.

Las moléculas de anticuerpo preferidas pueden incluir al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de la cadena pesada (VH) o sus fragmentos de unión al antígeno, y al menos una o preferiblemente dos regiones variables de la cadena ligera (VL) o sus fragmentos de unión al antígeno. Las regiones VH y VL se subdividen en regiones de hipervariabilidad, llamadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), interespaciadas con regiones que son más conservadas, llamadas "regiones estructurales" (FR). La extensión de las regiones estructurales y los CDRs se ha definido de forma precisa (ver, p.e., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Preferiblemente, cada VH y VL de una molécula de anticuerpo se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los CDRs y FRs pueden proceder de diferente origen.

La cadena VH o VL de una molécula de anticuerpo puede incluir todo o parte de una región constante de la cadena ligera o pesada. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas y dos ligeras de inmunoglobulinas, donde las cadenas pesadas y ligeras se interconectan por, p.e., puentes disulfuro. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de unión que interacciona con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median típicamente la unión de la molécula de anticuerpo a tejidos del huésped o factores, incluyendo varios tipos celulares del sistema inmune (p.e., células efectoras) y el primer componente (C1q) de la vía clásica del sistema de complemento. Las moléculas de anticuerpo pueden incluir IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como todos sus subtipos), donde las cadenas ligeras pueden ser del tipo kappa o lambda.

Como se discute arriba, los “fragmentos de unión al antígeno” de una molécula de anticuerpo están dentro del término molécula de anticuerpo. Un fragmento de unión al antígeno, como se usa aquí, puede referirse a una porción de un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de activación temprana (p.e., el polipéptido de activación temprana humano). Ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una o más CDRs aisladas con suficiente estructura para unirse específicamente, p.e., una porción de unión al antígeno de una región variable.

Los fragmentos de anticuerpo pueden también producirse por métodos químicos, p.e., por rotura de un anticuerpo intacto con una proteasa, tal como la pepsina o la papaína, u, opcionalmente, tratando el producto digerido con un agente reductor. Alternativamente, se pueden producir fragmentos útiles usando células del huésped transformadas con genes truncados de las cadenas pesadas y/o ligeras.

Una porción de unión al antígeno de una región variable de la cadena ligera y una porción de unión al antígeno de una región variable de la cadena pesada, p.e., los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por una unión sintética que les permita constituir una cadena sencilla de proteína en que el par de regiones VL y VH forme moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, p.e., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla son también incluidos dentro del término “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas, y los fragmentos son estudiados para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “anticuerpo o molécula de anticuerpo monoespecífica” se refiere a un anticuerpo o molécula de anticuerpo que muestra una sola especificidad de unión y afinidad por una diana particular, p.e., un epítipo. Este término incluye un “anticuerpo monoclonal” o una “composición de anticuerpo monoclonal”.

El término de anticuerpo o molécula de anticuerpo “recombinante”, como se emplea aquí, se refiere a anticuerpos o moléculas de anticuerpo que se preparan, expresan, crean o aíslan usando métodos recombinantes, tales como moléculas de anticuerpo expresadas usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, moléculas de anticuerpo aisladas de un recombinante, una librería de anticuerpo combinatoria, moléculas de anticuerpo aisladas de un animal (p.e., un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por cualquier otro medio que suponga la combinación de secuencias génicas de inmunoglobulinas humanas con otras secuencias de DNA. Tales moléculas de anticuerpo recombinantes incluyen moléculas de anticuerpo humanizadas, con CDR injertado, quiméricas, de inmunización, generadas *in vitro* (p.e., por selección de fagos), y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana.

Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados, que han sido modificados por, p.e., destrucción, adición, o sustitución de otras porciones del anticuerpo, p.e., la región constante, están también dentro del ámbito de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser modificado como sigue: (i) por destrucción de la región constante; (ii) por sustitución de la región constante con otra región constante, p.e., una región constante que aumente la vida media, estabilidad o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpo; o (iii) por la modificación de uno o más aminoácidos de la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glicosilación, la función de la célula efectora, la unión a receptores Fc (FcR), la fijación de complemento, el transporte a través de la placenta, entre otros.

En un ejemplo, la región constante del anticuerpo puede ser reemplazada por otra región constante de, p.e., una especie diferente. Este reemplazamiento puede ser realizado usando técnicas de Biología Molecular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la región VL o VH de un anticuerpo puede ser convertida a un gen de cadena pesada o ligera de longitud completa, respectivamente, por la unión operativa de los ácidos nucleicos que codifican para VH o VL a otros ácidos nucleicos que codifiquen las regiones constantes de las cadenas pesadas o ligeras. Las secuencias de los genes de las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas se conocen. Preferiblemente, la región

constante es humana, pero la región constante de otras especies, p.e., roedores (p.e., ratón o rata), primate, camello, conejo, pueden usarse también. Las regiones constantes de estas especies son conocidas (ver p.e., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Los métodos para la alteración de la región constante de un anticuerpo se conocen. Los anticuerpos con función alterada, p.e., afinidad alterada por un ligando efector, tal como el FcR en una célula ó el componente C1q del complemento pueden ser producidos por reemplazamiento de al menos un residuo aminoácido en la porción constante del anticuerpo con un residuo distinto (ver, p.e., EP 388,151 A1, US 5,624,821 y US 5,648,260, cuyos contenidos son incorporados aquí por referencia). Tipos similares de alteraciones se han descrito, de manera que si se aplican a inmunoglobulinas murinas o de otras especies, reducirían o eliminarían estas funciones.

Producción de anticuerpos Anti- polipéptido de activación temprana

Inmunógenos útiles para la generación de moléculas de anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana incluyen células que expresan el polipéptido de activación temprana, preparaciones de membrana de células que expresan el polipéptido de activación temprana, micelas o vesículas con el polipéptido de activación temprana, el polipéptido de activación temprana o fragmentos del mismo, p.e., el polipéptido de activación temprana aislado o purificado, p.e., el polipéptido de activación temprana humano, p.e., el polipéptido de activación temprana bioquímicamente aislado o una porción del mismo, o el polipéptido de activación temprana o alguno de sus fragmentos producidos de manera recombinante, p.e., el dominio extracelular o intracelular del polipéptido de activación temprana; o cualquier proteína de fusión conteniendo alguno de estos fragmentos del polipéptido de activación temprana. El antígeno es preferiblemente un antígeno humano. El polipéptido de activación temprana soluble se puede obtener, p.e., por producción recombinante del polipéptido de activación temprana en forma soluble (p.e., un polipéptido de activación temprana que carece de todo o parte de los dominios transmembrana y/o intracelular del polipéptido de activación temprana) o por lisis de una célula que expresa el polipéptido de activación temprana. Técnicas para la generación de anticuerpos anti-CD69 se describen en Sanchez-Mateos *et al.* (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:2317-2325, cuyo contenido es expresamente incorporado por referencia. Estas técnicas, así como otras conocidas en la bibliografía, se pueden usar para generar anticuerpos para CD69.

Los fragmentos de CD69 que incluyen los residuos 62-84 por porciones de ellos de SEQ ID NO:2, pueden ser usados para hacer anticuerpos frente a las regiones cuello de cada uno de los polipéptidos de activación temprana, respectivamente; p.e., los fragmentos pueden usarse como inmunógenos o usarse para caracterizar la especificidad de un anticuerpo. De manera similar, se pueden utilizar fragmentos de CD69, incluyendo los residuos 82 a 199, o porciones de ellos de SEQ ID NO:2; fragmentos de CD69 que incluyen los residuos 62 a 199 por porciones de ellos de SEQ ID NO:2 pueden usarse para hacer un anticuerpo frente a la región extracelular de la proteína activación temprana; fragmentos de CD69 que incluyen residuos del 1 a 40 o porciones de ellos de SEQ ID NO:2 pueden usarse para hacer un anticuerpo frente a una región intracelular de la proteína de activación temprana.

Moléculas de anticuerpo reactivas con, o específicas para, cualquier región o dominio de CD69 particularmente una región o dominio extracelular de CD69 pueden hacerse y examinarse para su adecuación para el uso en la invención.

Anticuerpos que sólo se unen a una proteína de activación temprana nativa, sólo a la desnaturalizada o proteína de activación temprana de cualquier forma no nativa, o que se unen a ambas formas, están dentro de la invención. Anticuerpos con epítomos lineales o conformacionales están dentro de la invención. Epítomos conformacionales pueden a veces ser identificados con anticuerpos que se unen a proteína de activación temprana nativa pero no a la forma desnaturalizada.

Como se describe abajo con más detalle, las moléculas de anticuerpo (preferentemente, anticuerpos monoclonales de distintos organismos, p.e., roedores, ovejas, humanos), contra el polipéptido de activación temprana pueden ser producidos usando métodos reconocidos en el campo. Una vez que el anticuerpo se obtiene, puede ser examinado para su adecuación para el uso en la invención, p.e., determinando si el anticuerpo se comporta como antagonista o eliminador.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por una variedad de técnicas, incluyendo metodología convencional para la generación de anticuerpos monoclonales, p.e., la técnica de hibridación celular somática estándar de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Ver generalmente, Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Aunque los procedimientos de hibridación celular somática son preferidos, en principio, otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse, p.e., transformación viral u oncogénica de linfocitos B. El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados por fusión son conocidos. Las parejas de fusión (p.e., células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión son también conocidos.

Un anticuerpo puede obtenerse de un origen no humano y las regiones variables, y en particular las CDRs, pueden secuenciarse y usarse para hacer moléculas de anticuerpo, p.e., anticuerpos humanizados, útiles en la invención. La localización de los CDRs y residuos estructurales debe determinarse (ver, p.e., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, que se incorporan aquí por referencia).

Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina pueden ser humanizados por métodos conocidos. Una vez que se obtienen los anticuerpos murinos, las regiones variables pueden secuenciarse. La localización de los CDRs y los residuos estructurales determinarse (ver Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, que se incorporan aquí por referencia). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras pueden, opcionalmente, ligarse a sus regiones constantes correspondientes.

Los anticuerpos de ratón anti-polipéptido de activación temprana pueden ser secuenciados usando técnicas conocidas.

Moléculas de anticuerpo o inmunoglobulinas humanizadas o con el CDR insertado pueden ser producidas por sustitución o inserción del CDR, donde uno, dos o todos los CDRs de una cadena de inmunoglobulina pueden ser reemplazados. Ver, p.e., U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* 1988 *Science* 239:1534; Beidler *et al.* 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US 5,225,539, cuyos contenidos son aquí expresamente incorporados por referencia.

Winter describe un método de inserción del CDR que puede ser usado para preparar anticuerpos humanizados en la presente invención (UK Patent Application GB 2188638A, presentada en el 26 de Marzo de 1987; Winter US 5,225,539), cuyos contenidos son expresamente incorporados por referencia. Todos los CDRs de un anticuerpo humano particular pueden ser reemplazados por al menos una porción de un CDR no humano o sólo algunos de los CDRs pueden ser reemplazados con CDRs no humanos. Sólo es necesario reemplazar el número de CDRs requerido para la unión del anticuerpo humanizado al antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanizados pueden ser generados por el remplazamiento de las secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión de antígeno, con secuencias equivalentes de las regiones variables Fv humanas. Métodos generales para la generación de anticuerpos humanizados se indican en Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, por Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214, y por Queen *et al.* US 5, 585, 089, US 5,693,761 y US 5,693,762, cuyos contenidos son incorporados aquí por referencia). Estos métodos incluyen el aislamiento, manipulación, y la expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican para todo o parte de las regiones variables Fv de las inmunoglobulinas de al menos una cadena pesada o ligera. El origen de tales ácidos nucleicos es conocido y, p.e., puede obtenerse de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se describe arriba. El DNA recombinante que codifica para el anticuerpo humanizado o un fragmento de él, puede entonces ser clonado en un vector de expresión apropiado.

Los anticuerpos humanizados en los cuales se han sustituido, destruido o añadido aminoácidos específicos, están así dentro de esta invención. En particular, anticuerpos humanizados preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región estructural, de manera que mejoran la unión al antígeno. Por ejemplo, una serie de residuos estructurales aceptores seleccionados de la cadena de inmunoglobulina humanizada pueden ser reemplazados por los correspondientes aminoácidos donadores. Las localizaciones preferidas de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacente al CDR, o que son capaces de interaccionar con un CDR (ver, p.e., US 5,585,089). Los criterios para seleccionar aminoácidos del donante se describen en US 5,585,089, p.e., columnas 12-16 de US 5,585,089, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia. La estructura aceptora puede ser una secuencia o secuencia consenso de una estructura de anticuerpo humano maduro. Como se usa aquí, el término "secuencia consenso" se refiere a la secuencia formada de la mayoría de los aminoácidos (o nucleótidos) más frecuentes que se encuentran en una familia de secuencias relacionadas (ver, p.e., Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). En una familia de proteínas, cada posición de la secuencia consenso es ocupada por el aminoácido más frecuente en dicha posición en la familia. Si dos aminoácidos se presentan en dicha posición con igual frecuencia, cualquiera de ellos se puede incluir en la secuencia consenso. Una "estructura consenso" se refiere a la región estructural en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

Otras técnicas para humanizar cadenas de inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos, son descritas en Padlan *et al.* EP 519596 A1, publicado el 23 de Diciembre de 1992.

La molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana se puede modificar también de otra manera para disminuir su inmunogenicidad, p.e., por delección específica de los epítomos reconocidos por la célula T humana o "deinmunización" por los métodos descritos en WO 98/52976 y WO 00/34317, cuyos contenidos son específicamente incorporados aquí por la referencia.

En algunos ejemplos, la molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana incluye una región variable de cadena pesada o ligera que tiene uno, dos, o preferiblemente, tres CDRs sustancialmente idénticos al CDR de la región variable de una cadena ligera o pesada anti-polipéptido de activación temprana no humana, respectivamente. En un ejemplo preferido, el anticuerpo modificado o el fragmento de unión al antígeno de éste incluye todas las seis CDRs del mismo anti-polipéptido de activación temprana no humano, p.e., cualquier molécula de anticuerpo anti-CD69 humana usada en la bibliografía, p.e., el panel de moléculas de anticuerpo anti-CD69 humano descrito en [Sanchez-Mateos, 1991 #126].

La cadena ligera o pesada de las inmunoglobulinas del anticuerpo modificado anti-polipéptido de activación temprana o su fragmento de unión al antígeno pueden incluir además una secuencia de la estructura variable de la cadena

ligera o pesada, procedente de la estructura variable de la cadena ligera o pesada presente en un anticuerpo humano o no-humano, p.e., un roedor.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra proteínas humanas pueden ser generados usando ratones transgénicos con los genes de la inmunoglobulina humana, más que en el sistema de ratón. Tales ratones transgénicos pueden incluir ratones que lleven una porción de los genes de la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, en el ratón HuMAb[®], de Medarex y GenMab, los genes de ratón para generar anticuerpos están inactivados y reemplazados por muchas de las secuencias clave para genes de anticuerpos humanos sin recombinar que codifican para las cadenas pesada y ligera. Otro ratón disponible es el XenoMouse[®], de Abgenix, que tiene aproximadamente el 806 de los genes de la cadena pesada de anticuerpo humana y una cantidad significativa de los genes de la cadena ligera humana. Otros ratones transgénicos están disponibles para generar anticuerpos humanos que contengan regiones completas de los genes constantes y variables encontrados en el correspondiente loci de la inmunoglobulina natural humana. Estos ratones, también referidos como ratones Kirin TC[™] son de Medarex. Los ratones Kirin TC[™] son "transcromosómicos", que quiere decir que los genes de ratón para crear anticuerpos se han inactivado y reemplazado por los cromosomas humanos que contienen todos los genes humanos para la generación de anticuerpos, incluyendo todas las clases de cadenas pesadas que codifican para todos los isotipos (IgG1-4, IgA1-2, IgD, IgM and IgE). También de Medarex, es el ratón KM[®], una cepa que resulta del cruce de los ratones HuMAb y Kirin-TC, de manera que combina sus características. El KM, como el ratón Kirin TC, retiene la capacidad de producir toda clase de isotipos humanos. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan mAbs humanos con afinidades específicas para epítopos de una proteína humana (ver, p.e., Wood *et al.* International Application WO 91/00906, Kucherlapati *et al.* PCT publication WO 91/10741; Lonberg *et al.* International Application WO 92/03918; Kay *et al.* International Application 92/03917; Lonberg, N. *et al.* 1994 Nature 368:856-859; Green, L.L. *et al.* 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S.L. *et al.* 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman *et al.* 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuallion *et al.* 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman *et al.* 1991 Eur. J. Immunol 21:1323-1326).

Los anticuerpos quiméricos, incluyendo las cadenas de inmunoglobulinas quiméricas, pueden ser producidas por técnicas de DNA recombinante conocidas. Por ejemplo, un gen que codifica para la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal de un ratón (u otra especie) se digiere con una enzima de restricción para quitar la región que codifica para el Fc de ratón, y la porción equivalente del gen que codifica para la región constante Fc humana es sustituida (ver Robinson *et al.*, International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, *et al.*, European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.*, European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.*, International Application WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.*, European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988 Science 240:1041-1043); Liu *et al.* (1987) PNAS 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314:446-449; and Shaw *et al.*, 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559).

También dentro del término se incluyen especies generadas *in vitro*, donde todo o parte de las CDRs, se generan por una selección no inmune, p.e., una muestra de fagos *in vitro*, chip de proteína, o cualquier otro método en el que las secuencias candidatas puedan ser medidas en su capacidad para unir el antígeno. P.e., los métodos de visualización combinatoria de anticuerpos, se han desarrollado para identificar y aislar fragmentos de anticuerpo que tienen una especificidad particular por un antígeno, y pueden ser usados para producir una molécula de anticuerpo.

Una vez mostrados en un sistema de visualización (p.e., un fago filamentoso), la librería de anticuerpos es escrutada con el antígeno, o un fragmento peptídico de éste, para identificar y aislar los grupos que expresen un anticuerpo con especificidad por este antígeno. El ácido nucleico que codifica para este anticuerpo seleccionado puede ser recuperado del sistema de visualización (p.e., del genoma del fago) y subclonado en otros vectores de expresión por técnicas estándar de DNA recombinante.

Anticuerpos específicos con altas afinidades por una proteína de superficie se pueden generar de acuerdo con métodos conocidos, p.e., métodos que impliquen la búsqueda en librerías (Ladner, R.C., *et al.*, U.S. Patent 5,233,409; Ladner, R.C., *et al.*, U.S. Patent 5,403,484). Además, los métodos de estas librerías pueden ser usados en búsquedas para obtener determinantes de unión que son miméticos a los determinantes estructurales de los anticuerpos.

Una región de unión al antígeno puede obtenerse también por búsqueda en varios tipos de librerías combinatorias con una actividad de unión deseada, y para identificar las especies activas, por métodos que se han descrito.

En un ejemplo, una librería de péptidos diferentes se expresa por una población de grupos de visualización para formar una librería de visualización de péptidos. Idealmente, los grupos de visualización comprenden un sistema que permite el muestreo de gran cantidad de librerías de péptidos distintos, una separación rápida tras cada ronda de separación por afinidad, y un fácil aislamiento del gen que codifica para el péptido de los grupos purificados. Las librerías de análisis de péptidos pueden ser en p.e., organismos procariontes o virus, que pueden amplificarse rápidamente, son relativamente fáciles de manipular, y pueden permitir la creación de un gran número de clones. Grupos de visualización preferidos incluyen, por ejemplo, bacterias vegetativas, esporas bacterianas, y, preferiblemente, virus bacterianos (especialmente virus de DNA). Sin embargo, la presente invención contempla también el uso de células eucarióticas, incluyendo levaduras y sus esporas, como grupos de visualización potenciales. Las moléculas de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana útiles en la presente invención pueden ser anticuerpos recombinantes producidos en

las células hospedadoras transformadas, p.e., con DNA codificante para las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo deseado. Las moléculas de anticuerpo recombinante pueden producirse por técnicas conocidas de ingeniería molecular. Por ejemplo, anticuerpos recombinantes se pueden producir clonando una secuencia de nucleótidos, p.e., una secuencia de cDNA o DNA genómico, que codifique para las cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo deseado de una célula de hibridoma que produce un anticuerpo útil en esta invención. La secuencia de nucleótido que codifica para estos polipéptidos es entonces insertada en vectores de expresión, de manera que ambos genes son unidos operativamente a sus propias secuencias de control transcripcional y traduccional. El vector de expresión y las secuencias control de expresión son elegidas por ser compatibles con la célula huésped usada. Típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Pueden usarse células huésped procarióticas o eucarióticas.

La expresión en células huésped eucarióticas se prefiere porque tales células son más adecuadas que las procarióticas para el adecuado ensamblaje y secreción de un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo. Sin embargo, cualquier anticuerpo producido que sea inactivo debido a un inadecuado plegamiento puede ser renaturalizado de acuerdo a métodos conocidos (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). Es posible que las células huésped produzcan porciones de anticuerpos intactos, tales como dímeros de cadenas ligeras o pesadas, que son también homólogos de anticuerpos, de acuerdo a la presente invención.

Se entenderá que las variaciones en el procedimiento indicado arriba son útiles en la presente invención. Por ejemplo, se puede desear transformar una célula huésped con DNA que codifique para ó la cadena ligera ó la pesada (pero no ambas) de un anticuerpo. La tecnología recombinante del DNA puede también utilizarse para quitar algo o todo el DNA que codifique para cada una o ambas cadenas pesada y ligera, que no son necesarias para la unión del polipéptido de activación temprana, p.e., la región constante puede ser modificada por, por ejemplo, la eliminación de aminoácidos específicos. Las moléculas expresadas de tales moléculas de DNA truncadas son útiles en los métodos de esta invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son anticuerpos anti- polipéptido de activación temprana y otra cadena pesada y ligera sean específicos para un antígeno distinto del polipéptido de activación temprana u otro epítipo del polipéptido de activación temprana.

30 *Conjugados de moléculas de anticuerpo*

Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden conjugarse, de manera covalente o no covalente, con otras estructuras, p.e., agentes terapéuticos o señales, p.e., toxinas (p.e., proteínas, (p.e., difteria o ricina) o toxinas químicas), isótopos terapéuticos, u otras estructuras terapéuticas.

De acuerdo con esto, una molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana puede ser derivatizada o unida a otra molécula funcional (p.e., otro péptido o proteína). Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención incluyen formas derivatizadas o modificadas de cualquier forma de los anticuerpos aquí descritos, incluyendo las moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención pueden ser unidos funcionalmente (por unión química, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo, (p.e., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puedan mediar la asociación de un anticuerpo o una porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región principal de la estreptavidina o una cola de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, p.e., para crear anticuerpos biespecíficos).

Agentes entrecruzantes adecuados son aquellos que son heterobifuncionales, teniendo dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (p.e., m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida ester) u homobifuncionales (p.e., disuccinimidil suberato). Tales enlaces están disponibles por Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o porción del mismo de la invención pueden ser derivatizados (o marcados) para incluir componentes fluorescentes, varias enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes o bioluminiscentes, átomos de metal con emisión de fluorescencia, p.e., europio (Eu), y otros lantánidos, y materiales radiactivos (descritos abajo). Ejemplos de agentes detectables por fluorescencia incluyen la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenesulfonilo, ficoeritrina, y otros del mismo tipo. Un anticuerpo puede ser también derivatizado con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la β -galactosidasa, la acetil-colin-esterasa, la glucosa oxidasa y otras del mismo tipo. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta por la adición de reactivos que la enzima usa como sustratos para generar un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable de la peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina lleva a un producto de reacción coloreado que es detectable. Un anticuerpo puede ser también derivatizado con un grupo prostético (p.e., estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un anticuerpo puede ser derivatizado con biotina y detectado a través de la medida indirecta de la unión de la avidina o la estreptavidina. Ejemplos de materiales de adecuada fluorescencia incluyen la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamina fluoresceína, el cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; y ejemplos de materiales bioluminiscentes son la luciferasa, luciferina y acuorina.

Un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana o un fragmento de él que se una al antígeno puede ser conjugado a otra entidad molecular, típicamente una marca o un agente o estructura terapéutica (p.e., citotóxica o citostática).

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es destructivo para las células con que interacciona. Ejemplos son el taxol, la citocalasina B, la gramicidina D, el bromuro de etidio, la emetina, la mitomicina, el etopósido, el tenopósido, la vincristina, la vinblastina, la colchicina, la doxorubicina, la daunorubicina, la dihidroxi-antracín-diona, la mitoxantrona, la mitramicina, la actinomicina D, la 1-dehidrotestosterona, los glucocorticoides, la procaína, la tetracaína, la lidocaína, el propanolol, la puomicina, los maitansinoides, p.e., maitansinol (ver US Patent No. 5,208,020), CC-1065 (ver US Patent Nos. 5, 475, 092, 5, 585, 499, 5,846,545) y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos, (p.e., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (p.e., mecloretamina, tioepa clorambucilo, CC-1065, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino); antraciclina (p.e., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.e., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p.e., vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).

Un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana o un fragmento de unión al antígeno de éste puede conjugarse a otra entidad molecular, p.e., una estructura que module la inmunogenicidad y/o la vida media. En un ejemplo, la entidad molecular es polietilén glicol (PEG) o derivados de éste. La PEGilación es un método de conjugación química que puede reducir la inmunogenicidad potencial y/o extender la vida media. Varios métodos de PEGilación de un anticuerpo se conocen. Ver, p.e., Bhandra *et al.* (2002) *Pharmazie* 57(1):5-29.

Otros reactivos de unión a un polipéptido de activación temprana

Se define un reactivo de unión a un polipéptido de activación temprana como un agente que interacciona (se une) con el polipéptido de activación temprana, preferiblemente de origen humano. La interacción ocurre preferentemente con alta afinidad (con una constante de unión de al menos 10^7 M^{-1} , preferiblemente entre 10^8 y 10^{10} M^{-1}) y especificidad. Los reactivos de unión a un polipéptido de activación temprana pueden ser antagonistas o eliminadores (deplecionantes) de CD69. Como ejemplos de reactivos de unión al polipéptido de activación temprana se pueden citar anticuerpos contra el polipéptido de activación temprana (como los reseñados anteriormente), así como moléculas de pequeño tamaño molecular o peptidomiméticos.

De utilidad en esta invención se incluyen agentes miméticos del polipéptido de activación temprana. Estos agentes, entre los que se incluyen péptidos, compuestos semipeptídicos o no peptídicos (como moléculas orgánicas de pequeño tamaño molecular), son inhibidores de la actividad del polipéptido de activación temprana.

En una encarnación óptima, el agente es parte de una librería combinatorial, por ejemplo una colección de péptidos o moléculas orgánicas, o parte de una librería de productos naturales. En estas circunstancias, un grupo de compuestos de test puede incluir 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 compuestos, que comparten características estructurales o funcionales.

En su forma actual, esta invención incluye librerías de agentes de unión al polipéptido de activación temprana. La génesis de librerías combinatoriales está bien caracterizada en la literatura y se ha revisado exhaustivamente (por ejemplo, ver: E.M. Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.* (1994) 37:1385-1401; DeWitt, S. H.; Czarnik, A. W. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29:114; Armstrong, R. W.; Combs, A. P.; Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Keating, T. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29:123; Ellman, J. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29:132; Gordon, E. M.; Gallop, M. A.; Patel, D. V. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29:144; Lowe, G. *Chem. Soc. Rev.* (1995) 309; Blondelle *et al. Trends Anal. Chem.* (1995) 14:83; Chen *et al. J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116:2661; Patentes U.S. 5,359,115, 5,362,899, y 5,288,514; PCT Publication No. WO92/10092, WO93/09668, WO91/07087, WO93/20242, WO94/08051).

Las librerías de compuestos de esta invención pueden prepararse de acuerdo a diferentes métodos, algunos de los cuales han sido previamente caracterizados. Por ejemplo, una estrategia denominada de división puede implementarse de la siguiente manera: se colocan microsféricas de sustrato polimérico funcionalizado en diferentes recipientes de reacción; existe una gran variedad de sustratos poliméricos adecuados para la síntesis peptídica en fase sólida, y algunos están disponibles comercialmente (como ejemplos, ver M. Bodansky "Principles of Peptide Synthesis", 2ª edición (1993), Springer-Verlag, Berlin). Se añade a cada alícuota de microsféricas una solución conteniendo un aminoácido activado, y las reacciones se llevan a cabo, resultando en una serie de aminoácidos inmovilizados, cada uno en un recipiente de reacción. Las alícuotas de microsféricas derivatizadas se lavan y se reúnen ("recombinación"), y este conjunto se divide nuevamente, colocando cada alícuota en un nuevo recipiente de reacción, añadiéndose un nuevo aminoácido activado a cada alícuota. Este ciclo se repite hasta que se consiguen péptidos de la longitud deseada. Los aminoácidos añadidos en cada ciclo se seleccionan aleatoriamente, o bien se pueden seleccionar para obtener una librería "dirigida", es decir, en la que ciertas partes del inhibidor se seleccionan por un método no aleatorio, por ejemplo, para seleccionar inhibidores con homología o similitud estructural con un péptido conocido capaz de interaccionar con un anticuerpo, como por ejemplo el sitio de unión de antígeno de anticuerpos anti-idiotípicos. Así se puede obtener una amplia variedad de compuestos peptídicos, peptidomiméticos no peptídicos.

Esta estrategia de división produce una librería de péptidos, algunos de ellos inhibidores, que pueden utilizarse para preparar una librería de compuestos de ensayo de la invención. En otro ejemplo ilustrativo, se genera una librería de diversómeros de acuerdo con el método de Hobbs DeWitt *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6909 (1993)). Otros métodos de síntesis, como el de la “bolsita de té” de Houghten (ver Houghten *et al.*, *Nature* 354:84-86 (1991)) pueden emplearse para generar librerías de compuestos de la invención sujeto.

Posteriormente se pueden realizar *screenings* (barridos), para determinar qué miembros de la librería poseen una actividad deseable, y si así es, identificar el principio activo. Se han descrito métodos de análisis combinatorial de *screening* de librerías (ver Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.*, *supra*). Las librerías de compuestos solubles se pueden identificar por cromatografía de afinidad con un receptor apropiado para aislar ligandos para el receptor, seguida por la identificación de los ligandos aislados por técnicas convencionales, como espectrometría de masas, RMN y similares. Los compuestos inmovilizados pueden identificarse poniéndolos en contacto con un receptor soluble, preferiblemente acoplado a un marcador (fluoróforos, enzimas colorimétricas, radioisótopos, compuestos luminiscentes y similares) que pueden ser detectados indicando unión al ligando. Alternativamente, los compuestos inmovilizados pueden ser liberados selectivamente, permitiéndose su difusión a través de una membrana para interaccionar con un receptor. Se describen ejemplos representativos para el *screening* de las librerías de la invención.

Así, se puede probar la interacción de los compuestos de esta invención con el polipéptido de activación temprana ensayando la capacidad de cada compuesto para interaccionar con el mismo, por ejemplo, incubando el compuesto investigado con el polipéptido de activación temprana y un lisado en un recipiente de reacción adecuado, como una placa estándar de 96 pocillos. En esta situación, la actividad de cada compuesto individual puede ser determinada, empleándose como control un pocillo o pocillos sin el compuesto ensayado. Tras la incubación, la actividad de cada compuesto puede determinarse en cada pocillo. Por tanto, pueden determinarse las actividades de una pluralidad de compuestos en paralelo.

Así se puede determinar simultáneamente la unión de grandes cantidades de compuestos diferentes. Por ejemplo, los compuestos se pueden sintetizar en microsferas de resina sólida siguiendo un patrón “una microsfere-un compuesto”; los compuestos se pueden inmovilizar en la resina a través de un puente fotolábil. Posteriormente, las esferas (100,000 o más) pueden combinarse en células de levadura y pulverizadas en forma de “nano-gotas”, de tal manera que cada gota incluya una única esfera (y por lo tanto un compuesto). La exposición de las nano-gotas a la luz UV resulta en la liberación de los compuestos de las gotas, lo que resulta en un método que permite el *screening* rápido de librerías de gran tamaño.

Las librerías combinatoriales de compuestos pueden sintetizarse con “etiquetas” que codifican la identidad de cada miembro de la librería (ver W.C. Still *et al.*, Patentes U.S. No. 5,565,324 and Publicación PCT No. WO 94/08051 y WO 95/28640). En general, este método incluye el uso de marcadores inertes, pero fácilmente detectables, que se unen al soporte sólido o a los compuestos. Cuando se encuentra un compuesto activo (por una de las técnicas descritas anteriormente), la identidad de dicho compuesto se determina por la identificación de la etiqueta que le acompaña. Este método de marcaje permite la síntesis de grandes librerías de compuestos que pueden identificarse incluso a niveles muy bajos. Tal esquema de marcaje puede ser útil (por ejemplo, en el sistema de *screening* de “nano-gota”), para identificar compuestos liberados de las microsferas.

Las librerías de compuestos han de contener al menos 30 compuestos, y es preferible que contengan de 100 a 500, aunque no deben exceder de 10^7 - 10^9 .

Ensayos de búsqueda o *screening*

Esta invención proporciona métodos (también referidos como ensayos de *screening*) para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, moléculas de pequeño tamaño molecular u otras drogas) que se unen a la proteína de activación temprana o a los ácidos nucleicos codificantes para la misma y tienen un efecto estimulador o inhibidor en, por ejemplo, la expresión o la actividad del polipéptido de activación temprana. Los compuestos identificados de esta forma pueden usarse para modular la actividad de los productos génicos diana (genes del polipéptido de activación temprana) en un protocolo terapéutico, para elaborar su función biológica o para identificar compuestos que bloqueen las interacciones normales del gen diana.

Así, esta invención incluye ensayos para identificar compuestos candidatos que sean sustratos de la proteína o polipéptido de activación temprana, o una porción biológicamente activa de la misma. Por otra parte, esta invención incluye ensayos para el *screening* de compuestos candidatos o que puedan unirse o modular una actividad de la proteína o polipéptido de activación temprana, o una porción biológicamente activa de la misma, por ejemplo, moduladores de la señalización por el polipéptido de activación temprana.

Se pueden utilizar ensayos de actividad de la proteína de activación temprana en la presencia de inhibidores para determinar la naturaleza de la actividad señalizadora. El ensayo puede incluir controles adicionales y pasos para asegurar que la actividad observada proviene del polipéptido de activación temprana, por ejemplo, muestras control, como muestras producidas a partir de células transformadas con un vector control en vez de un vector que sobreexpresa el DNA del polipéptido de activación temprana. La actividad puede también observarse en fracciones cromatográficas para determinar, por ejemplo, si la actividad observada y el polipéptido de activación temprana copurifican. Se han

descrito ensayos y condiciones adicionales, ver Yamaoka *et al.* (1998) *J. Biol Chem* 273:11895-11901, y Thien-Khai *et al.* (1997) *J. Biol Chem* 272:31315-31320.

Los compuestos ensayados en la presente invención pueden obtenerse empleando cualquiera de los numerosos métodos de obtención de librerías combinatorias descritos en la literatura, incluyendo: librerías biológicas; librerías de peptoides (librerías de moléculas que tienen funcionalidad peptídica, pero con un esqueleto no peptídico que es resistente a la degradación enzimática pero que, no obstante, permanece bioactivo; ver Zuckermann, R.N. *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85); librerías de fase sólida o en solución manipulables espacialmente de forma paralela; librerías sintéticas que requieren convolución; el método “una-esfera un-compuesto”; y librerías sintéticas empleando selección por cromatografía de afinidad. Las aproximaciones biológicas y de peptoides están limitadas a librerías peptídicas, mientras que las otras cuatro aproximaciones se pueden aplicar a librerías de péptidos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas de pequeño tamaño molecular (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la génesis de librerías moleculares en la literatura, por ejemplo en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las librerías de compuestos se pueden presentar en solución (ver Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o en microsferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), biochips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner, Patentes U.S. No. 5,223,409), esporas (Ladner Patentes U.S. No. 5,223,409), plásmidos (Culi *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) o en fagos (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 22:301-310; Ladner *supra.*).

Se define un ensayo como aquella prueba basada en células en la que una célula que expresa la proteína de activación temprana o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto y se determina la capacidad del mismo para modular la actividad del polipéptido de activación temprana. La determinación de la capacidad del compuesto ensayado para modular la actividad del polipéptido de activación temprana se puede realizar monitorizando, por ejemplo, la percepción de estímulos ambientales, como por ejemplo, un ligando del polipéptido de activación temprana, o de mensajeros biológicos, como el TGF- β . La célula puede ser de mamífero, por ejemplo, humana.

También se puede evaluar la capacidad del compuesto para modular la unión del polipéptido de activación temprana al mismo o a otro compuesto, por ejemplo, un sustrato del polipéptido de activación temprana. Esto puede conseguirse acoplando el compuesto a un radioisótopo (por ejemplo, sustrato) o un “marcage” enzimático, de tal forma que la unión del compuesto al polipéptido de activación temprana puede detectarse a través del marcage, en un complejo. Alternativamente, el polipéptido de activación temprana puede acoplarse a un radioisótopo o “etiqueta” enzimática para monitorizar la capacidad de un compuesto para modular la unión del polipéptido de activación temprana a un sustrato del polipéptido de activación temprana en un complejo. Por ejemplo, los compuestos (pueden ser sustratos del polipéptido de activación temprana) pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ó ^3H , tanto directa como indirectamente, y detectarse el radioisótopo por conteo directo de radioemisión o por conteo de centelleo. Alternativamente, los compuestos pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina o luciferasa, detectando el marcage enzimático mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado a producto.

La capacidad de un compuesto (por ejemplo, un sustrato del polipéptido de activación temprana) de interactuar con el polipéptido de activación temprana, con o sin el marcage de cualquiera de los interactuantes también puede evaluarse. Por ejemplo, se puede emplear un microfisiómetro para detectar la interacción de un compuesto con el polipéptido de activación temprana sin el marcage de ninguna de las partes (compuesto o polipéptido de activación temprana) (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912). Empleado en este contexto, un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad con la que la célula acidifica su entorno empleando un sensor potenciométrico estimulado por la luz (*light-addressable potentiometric sensor, LAPS*). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden emplear como indicación de la interacción entre un compuesto y el polipéptido de activación temprana.

También se incluye un ensayo en el que no se emplean células en el que la proteína de activación temprana o una porción biológicamente activa de la misma se pone en contacto con un compuesto, evaluándose su capacidad de unión a la misma. En estos ensayos, las porciones biológicamente activas de la proteína de activación temprana empleadas preferentemente incluyen fragmentos que participan en interacciones con moléculas distintas del polipéptido de activación temprana, por ejemplo, fragmentos con altas probabilidades de superficie.

Las formas solubles o asociadas a la membrana de proteínas aisladas (las proteínas CD69, AICL, o LIT1, o porciones biológicamente activas de la misma) pueden ser empleadas en los ensayos libres de células incluidos en esta invención. Cuando se empleen formas asociadas a la membrana de la proteína, es aconsejable emplear un agente solubilizador, como detergentes no iónicos como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoli(éter de etilenglicol)_n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-ammonio-1-propano.

Los ensayos sin células implican la preparación de una mezcla de reacción con la proteína diana y el compuesto ensayado en condiciones tales y durante el tiempo suficiente para permitir la interacción y unión de los dos componentes, formando un complejo que puede ser eliminado y/o detectado.

También se puede detectar la interacción entre dos moléculas empleando técnicas como la transferencia de energía fluorescente (Fluorescence Energy Transfer, FET) (ver, por ejemplo, Lakowicz *et al.*, Patentes U.S. No. 5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, Patentes U.S. No. 4,868,103). Se selecciona un marcaje fluorescente en la primera molécula (donadora), de tal forma que la energía fluorescente emitida por la marca será absorbida por un segundo marcador fluorescente presente en la segunda molécula (aceptora), que emite a su vez fluorescencia al excitarse mediante la energía absorbida. Alternativamente, la proteína donadora puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se escogen marcadores fluorescentes de distinta longitud de onda de emisión, de tal forma que la emisión del donador pueda ser identificada inequívocamente de la del aceptor. Dado que la eficiencia de la transferencia de energía fluorescente depende de la distancia que separa a las moléculas, la relación espacial entre las mismas puede evaluarse. En una situación en la que se produzca unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del aceptor ha de ser máxima. Así, la FET debida a la unión de dos moléculas puede ser medida a través de técnicas de detección de fluorescencia estándar (como un fluorímetro).

La detección de la unión de CD69 a una molécula diana puede realizarse también empleando análisis de interacciones biomoleculares (*Biomolecular Interaction Analysis, BIA*) (ver Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). La resonancia de superficie de plasmón (*surface plasmon resonance, SPR*) o "BIA" detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcaje de ninguna de las moléculas participantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa de la superficie de interacción (indicación de una interacción) causan alteraciones en el índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno de SPR), lo que resulta en una señal detectable que puede emplearse como indicador de una reacción en tiempo real entre moléculas biológicas.

Por otra parte, el producto génico diana o el compuesto investigado se puede anclar en una fase sólida, y puede detectarse al final de la reacción. Preferiblemente, se ancla el producto génico diana y el compuesto investigado (que no está inmovilizado) se puede marcar, bien directa bien indirectamente con marcadores detectables como los que se han descrito previamente.

Puede ser de interés el inmovilizar la proteína de activación temprana, un anticuerpo contra el polipéptido de activación temprana o su molécula diana para facilitar la separación de formas complejadas de no complejadas de una o ambas proteínas, así como para facilitar la automatización del ensayo. La unión de los compuestos ensayados al polipéptido de activación temprana, o la unión de dicho polipéptido de activación temprana con una molécula diana en la presencia o ausencia del compuesto ensayado puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas multipocillo, tubos de ensayo o de microcentrífuga. En una encarnación de estos ejemplos, se puede emplear una proteína de fusión que permite la unión de la molécula a una matriz. Por ejemplo, se pueden adsorber proteínas de fusión del tipo glutation-S-transferasa/ polipéptido de activación temprana o glutation-S-transferasa/proteína diana a microsfaras con glutation (Sigma Chemical, St. Louis, MO), o a placas multipocillo derivatizadas con glutation, que se combinan con el compuesto investigado o polipéptido de activación temprana y la proteína diana no adsorbida o polipéptido de activación temprana, incubándose dicha mezcla en condiciones favorables para la formación de complejos (incluyendo condiciones fisiológicas de fuerza iónica y pH). Después de la incubación, la matriz se lava para eliminar componentes no ligados y la formación de complejos se determina directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente, o bien los complejos pueden disociarse de la matriz y el nivel de unión o actividad del polipéptido de activación temprana se puede determinar por técnicas convencionales.

Otras técnicas para inmovilizar o un polipéptido de activación temprana o una molécula diana en matrices incluye la conjugación de biotina y estreptavidina. La proteína de activación temprana biotinilada u otras moléculas diana pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) empleando técnicas descritas en la literatura (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizadas en placas de 96 pocillos recubierta con estreptavidina.

Para realizar este ensayo, el componente no inmovilizado se añade sobre la superficie que se ha recubierto con el componente anclado. Tras acabar la reacción, se eliminan los componentes en exceso (lavado), en condiciones en las que se garantiza el mantenimiento de los complejos inmovilizados. La detección de los mismos se puede realizar de diferentes maneras: cuando el componente no inmovilizado está previamente marcado, la detección del marcaje anclado en la superficie indica la formación de complejos. Cuando el componente no inmovilizado no está marcado, se puede utilizar un marcaje indirecto para detectar complejos inmovilizados, por ejemplo, empleando un anticuerpo marcado específico del componente inmovilizado (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directa o indirectamente, en este último caso, empleando un anticuerpo anti-Ig marcado).

Este ensayo se realiza empleando anticuerpos reactivos contra la proteína de activación temprana o una molécula diana, pero que no interfieren con la unión del polipéptido de activación temprana a su molécula diana. Tales anticuerpos pueden derivatizarse en pocillos, y la diana no ligada, o bien el polipéptido de activación temprana, puede ser capturado en los pocillos por conjugación con anticuerpos. Como métodos para detectar estos complejos, se pueden citar la inmunodetección de complejos, empleando anticuerpos reactivos contra el polipéptido de activación temprana,

o la molécula diana, así como ensayos enzimáticos basados en la detección de una actividad enzimática asociada con el polipéptido de activación temprana o su diana.

Alternativamente, los ensayos sin células pueden realizarse en fase líquida. En tales ensayos, los productos de reacción se separan de los compuestos no reactivos por técnicas convencionales que incluyen: centrifugación diferencial (ver Rivas, G., y Minton, A.P., (1993) *Trends Biochem Sci* 18:284-7); cromatografía (de exclusión molecular, de intercambio iónico); electroforesis (ver Ausubel, F. et al., eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley: New York.); e inmunoprecipitación (ver Ausubel, F. et al., eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley: New York). Tales técnicas son habituales en cualquier laboratorio (Heegaard, N.H., (1998) *J Mol Recognit* 11:141-8; Hage, D.S., y Tweed, S.A. (1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 699:499-525). También puede utilizarse transferencia de energía fluorescente (FET) para detectar unión sin purificar los complejos.

Preferentemente, este ensayo incluye el contacto de la molécula de activación temprana o una parte biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une al polipéptido de activación temprana formando un complejo, y añadiendo un segundo compuesto del que se determina su capacidad para unirse, preferentemente, al polipéptido de activación temprana o a una parte biológicamente activa del mismo, o bien se mide su actividad moduladora de la actividad de una molécula diana, empleándose como referencia un compuesto conocido.

Los productos génicos diana de esta invención pueden, *in vivo*, interactuar con una o más macromoléculas celulares o extracelulares, como proteínas, que, a efectos de discusión, se denominarán "ligandos". Aquellos compuestos que bloquean estas interacciones pueden ser útiles en la regulación de la actividad de los productos génicos diana. Tales compuestos incluyen, pero no están limitados a: moléculas como anticuerpos, péptidos y moléculas de pequeño tamaño molecular. Los productos génicos diana de preferencia son los genes del polipéptido de activación temprana identificados aquí. Un aspecto alternativo de esta invención incluye métodos para determinar la capacidad del compuesto estudiado de modular la actividad de la proteína de activación temprana a través de la modulación de una molécula activada por la misma, por ejemplo, la actividad de una molécula efectora sobre una molécula diana, o la unión de un efector a una diana apropiada. El ensayo de referencia en este caso es la determinación de la actividad TGF- β .

Para identificar compuestos que interfieren con la interacción entre los productos génicos diana y sus ligandos celulares o extracelulares, se prepara una mezcla de reacción conteniendo el producto génico diana y su ligando, en condiciones adecuadas y durante tiempo suficiente para la formación de complejos. Para ensayar un agente inhibidor, la mezcla de reacción se incuba en presencia o ausencia del mismo, pudiendo estar presente en la mezcla de reacción desde el primer momento o añadirse un tiempo después de la incubación del gen diana y su ligando celular o extracelular. Las mezclas de reacción control se incuban en ausencia del compuesto o con un placebo. Se detecta entonces la formación de complejos entre el gen diana y el ligando. La formación de complejos en la reacción control pero no en el caso en que la reacción incluye el compuesto ensayado indica que el compuesto interfiere con la interacción del gen diana y el ligando. Además, se puede comparar la formación de complejos en la mezcla de reacción que contiene el compuesto ensayado y el producto normal del gen diana con la formación de complejos en la mezcla de reacción que contiene el compuesto ensayado y productos mutantes del gen diana, lo que es importante en aquellos casos en los que es deseable identificar los compuestos que interrumpen las interacciones de los genes diana mutantes pero no los normales.

Estos ensayos se pueden realizar en formatos homogéneos o heterogéneos, que incluyen el anclaje de bien, el gen diana o bien el ligando a una fase sólida, y la detección de los complejos anclados en fase sólida al final de la reacción. En ensayos homogéneos, la reacción se realiza en fase líquida al completo. Tanto en una como en otra situación, el orden de adición de los reactivos se puede variar para obtener diferente información sobre los complejos objetivo del ensayo. Por ejemplo, los compuestos ensayados que interfieren con la interacción entre los productos diana y sus ligandos, por ejemplo por competición, pueden identificarse realizando la reacción en presencia de las sustancias ensayadas. Alternativamente, los compuestos ensayados que deshacen los complejos preformados, por ejemplo, compuestos con altas constantes de unión que desplazan a uno de los componentes del complejo, pueden ensayarse añadiendo el compuesto ensayado a la mezcla de reacción después de que los complejos se hayan formado. Los formatos de ensayo se describen brevemente a continuación.

En un sistema de ensayo heterogéneo, o bien el producto génico diana, o bien el ligando celular o extracelular se ancla en una fase sólida (por ejemplo, placas de titulación), mientras que el reactivo no anclado se marca directa o indirectamente. El reactivo anclado puede inmovilizarse mediante uniones covalentes o no covalentes. Alternativamente, se puede emplear un anticuerpo específico para el reactivo, que actúe de puente entre el sustrato y el reactivo para su unión a la fase sólida.

Para realizar el ensayo, el ligando del reactivo inmovilizado se aplica sobre la superficie de reacción en presencia o ausencia del compuesto ensayado. Tras la finalización de la reacción, se lavan los reactivos que no han reaccionado en condiciones tales que los complejos formados permanezcan inmovilizados sobre la superficie. Cuando el reactivo no inmovilizado está marcado previamente, la detección del marcaje inmovilizado en la superficie indica la formación de complejos. Cuando el reactivo no inmovilizado no está marcado, se puede emplear un marcaje indirecto para la detección de los complejos en la superficie de reacción, por ejemplo, empleando un anticuerpo específico para el reactivo no inmovilizado marcado (que puede, a su vez, estar marcado directa o indirectamente, en este caso mediante un anticuerpo anti-Ig). Dependiendo del orden de adición de los componentes de la reacción, los compuestos ensa-

yados pueden agruparse en aquellos que inhiben la formación de complejos o aquellos que deshacen los complejos previamente formados.

Alternativamente, la reacción puede realizarse en fase líquida, en presencia o ausencia del compuesto ensayado, separando los productos de reacción de los reactivos no reaccionados, detectándose posteriormente los complejos mediante, por ejemplo, el uso de anticuerpos específicos para uno de los componentes de unión inmovilizados para anclar cualquier complejo formado en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro ligando para detectar complejos anclados. Nuevamente, y dependiendo del orden de adición de los reactivos a la fase líquida, pueden distinguirse entre compuestos que inhiben la formación de complejos y aquéllos que deshacen los complejos formados previamente.

Constituyendo una alternativa a lo presentado anteriormente, se pueden emplear ensayos homogéneos. Por ejemplo, se pueden preparar complejos preformados del producto génico diana y sus ligandos celulares o intracelulares, en los que uno u otro están marcados, pero la señal generada por el marcaje está apantallada por la formación del complejo (Patentes U.S. nº 4,109,496, que utiliza esta aproximación para inmunoensayos). La adición de una sustancia que compite y desplaza a uno de los componentes del complejo preformado resultará en un incremento de la señal. De esta forma se pueden identificar sustancias que bloquean la interacción del producto génico diana y sus ligandos.

La proteína de activación temprana puede emplearse como cebo en ensayos de doble o triple híbrido (ver, por ejemplo, Patentes U.S. No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Celi* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; y Brent WO94/10300) para identificar otras proteínas que se unen o interaccionan con el polipéptido de activación temprana (polipéptido de activación temprana binding proteins o polipéptido de activación temprana -bp), y que se involucran en la actividad del polipéptido de activación temprana (por ejemplo, expresión de TGF- β). Tales polipéptidos de activación temprana -bp pueden ser activadoras o inhibidoras de la señalización por el polipéptido de activación temprana o sus dianas, como por ejemplo, elementos activados por la señalización inducida por el polipéptido de activación temprana.

El sistema de doble híbrido se basa en la naturaleza modular de la mayor parte de los factores de transcripción, que consisten en dominios independientes de unión a DNA y de activación. Brevemente, el ensayo utiliza dos construcciones de DNA diferentes. Una de ellas codifica para el polipéptido de activación temprana fusionado al dominio de unión a DNA de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción se incluye una secuencia de DNA procedente de una genoteca, que codifica para una proteína no identificada ("presa" o "muestra"), fusionada a un gen que codifica para el dominio de activación del factor de transcripción conocido (alternativamente, se puede fusionar el polipéptido de activación temprana al dominio de activación). Si el "cebo" y la "presa" son capaces de interaccionar *in vivo* formando un complejo dependiente del polipéptido de activación temprana, los dominios de unión a DNA y activación del factor de transcripción quedan muy cercanos, lo que permite la transcripción de un gen reportero (por ejemplo, lacZ), que está asociado operacionalmente a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor. La expresión del reportero se puede detectar y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional se emplean para obtener el gen clonado, que codifica para la proteína que interacciona con el polipéptido de activación temprana.

Otro aspecto incluye la identificación de moduladores de la expresión del polipéptido de activación temprana. Por ejemplo, una mezcla con o sin células se incuba con un compuesto candidato y se evalúa la expresión del m-RNA o la proteína de activación temprana en relación a la expresión de los mismos en ausencia del compuesto. Cuando la expresión de m-RNA o proteína de activación temprana es menor (estadísticamente significativa) en presencia del compuesto estudiado que en su ausencia, éste se identifica como un inhibidor de la expresión del m-RNA o la proteína de activación temprana (es decir, antagonista del polipéptido de activación temprana). El nivel de expresión de m-RNA o proteína de activación temprana puede determinarse mediante métodos conocidos para la determinación de los niveles de m-RNA o proteína.

En otro apartado, esta invención contempla la combinación de dos o más de los ensayos aquí descritos. Por ejemplo, un agente modulador puede identificarse empleando un ensayo celular sin células, y la capacidad del mismo para modular la actividad del polipéptido de activación temprana puede confirmarse *in vivo* en modelos animales como, por ejemplo, de cáncer.

Esta invención también incluye nuevos agentes identificados por los ensayos de *screening* descritos anteriormente. De acuerdo con esto, se encuentra dentro de la utilización de esta invención el posterior empleo de un agente identificado como se ha descrito aquí (por ejemplo, un agente modulador del polipéptido de activación temprana, una molécula de ácido nucleico antisentido del polipéptido de activación temprana, un anticuerpo específico contra el polipéptido de activación temprana, o cualquier otro ligando del polipéptido de activación temprana) en un modelo animal apropiado para determinar la eficacia, toxicidad, efectos secundarios o mecanismo de acción de un tratamiento con tales agentes. Más aún, se pueden usar nuevos reactivos identificados por los ensayos de *screening* descritos anteriormente para tratamientos como los que se describen aquí.

Sustancialmente idéntico u homólogo

El término sustancialmente idéntico u homólogo se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (es decir, con cadenas laterales semejantes, sustituciones de aminoácidos conservados, etc) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos, tal que la primera y la segunda secuencia tienen actividades similares. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y al menos un 50% de la afinidad demostrada para el primero.

Los cálculos de homología entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue: las secuencias se alinean para realizar una comparación óptima (es posible introducir espacios vacíos (“gaps”) en una o ambas secuencias para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas pueden descartarse). De forma ideal, la longitud de una secuencia de referencia alineada para comparación de secuencia es al menos un 30% de la secuencia total, aunque es tanto mejor cuanto mayor es el porcentaje. Así, se comparan los residuos aminoacídicos o los nucleótidos de ambas cadenas en posiciones correspondientes. Cuando existe una coincidencia exacta para ambas secuencias en una posición determinada, entonces ambas secuencias son idénticas en dicha posición (se emplean indistintamente los términos “identidad” y “homología”). El porcentaje de identidad entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas encontradas en ambas secuencias, teniendo en cuenta el número de *gaps* cuya introducción se requiere para un alineamiento óptimo, así como la longitud de los mismos.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede realizarse empleando algoritmos matemáticos. Idóneamente, se emplea el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:444-453), que se ha implementado en el programa GAP del paquete de software GCG, empleando bien una matriz Blossum 62, bien una PAM250 y un “*gap weight*” de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y una “*length weight*” de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Otra forma idónea de calcular el porcentaje de homología es emplear el programa GAP del software GCG, empleando una matriz NWSgapdna. CMP y un “*gap weight*” de 40, 50, 60, 70 u 80 y una “*length weight*” de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. El grupo de parámetros de referencia (que debería emplearse si el investigador no está seguro de los parámetros que deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de la limitación de homología de la invención) está constituido una matriz Blossum 62 con una penalización de *gap* de 12, una extensión de la penalización de *gap* de 4 y una penalización de “*frameshift gap*” de 5.

Tal y como se emplea en este texto, el término “hibrida en condiciones de baja, media, alta o muy alta estringencia”, describe las condiciones de hibridación y lavado. Se pueden encontrar guías para la realización de reacciones de hibridación en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esta cita se describen métodos en solución acuosa o no acuosa que pueden ser empleadas. Las condiciones específicas de hibridación que se refieren aquí son las siguientes: 1) baja estringencia, cloruro/citrato sódico (CCS) 6× a 45°C, seguido por dos lavados en 0.2× CCS, 0.1% SDS a al menos 50°C (la temperatura de los lavados puede incrementarse a 55°C); 2) estringencia media, 6× CCS a 45°C seguido por al menos un lavado en 0.2× CCS, 0.1% SDS a 60°C; 3) estringencia alta, 6× CCS a 45°C seguido por al menos un lavado en 0.2× CCS, 0.1% SDS a 65°C, o preferiblemente 4) muy alta estringencia, 0.5M fosfato sódico, 7% SDS a 65°C, seguido de dos lavados en 0.2× CCS, 0.1% SDS a 65°C, siendo la condición (4) la de referencia a no ser que se especifique lo contrario.

Se entiende que los polipéptidos de unión de esta invención pueden tener sustituciones adicionales conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial en la funcionalidad de los polipéptidos. Se puede determinar si una sustitución en concreto será tolerable (no afectará adversamente a las propiedades biológicas deseadas, como la actividad de unión) de acuerdo con lo descrito por Bowie *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310. Una “sustitución de aminoácido conservada” se define como aquella en la que un residuo es reemplazado por otro que posee una cadena lateral similar, lo que está bien establecido en la literatura. Las familias de aminoácidos con cadenas laterales semejantes son: cadenas laterales básicas (lisina, arginina, histidina), ácidas (ácidos aspártico y glutámico), cadenas laterales no cargadas pero polares (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales β-ramificadas (treonina, valina, isoleucina) y aromáticas (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Un residuo “no esencial” se define como aquel que puede ser alterado con respecto a la forma salvaje (“*wild type*”) del reactivo de unión (anticuerpo u otros), sin inhibir, o mejor aún, sin alterar sustancialmente la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es aquel que resulta en dichos cambios.

Compuestos farmacéuticos

Por otra parte, la presente invención incluye compuestos (farmacológicamente aceptables), que incluyen un reactivo de unión al polipéptido de activación temprana (anticuerpo anti- polipéptido de activación temprana), como se describe aquí, formulado conjuntamente con un portador (*carrier*) adecuado.

En la categoría de portadores farmacológicamente aceptables se incluyen todos las soluciones, medios de dispersión, recubrimientos, reactivos antibacterianos y antifúngicos, reactivos isotónicos y de retardo de la absorción y similares que son compatibles fisiológicamente. El portador ha de ser adecuado para su administración intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el principio activo (el reactivo de unión al polipéptido de activación temprana), puede recubrirse en un material que lo proteja de la acción de los ácidos u otras condiciones naturales que pudieran inactivarlo.

Una “sal farmacológicamente aceptable” se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto del que se parte, y que no causa ningún efecto toxicológico no deseado (ver Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Entre tales sales se incluyen sales de adición de ácido o de base. Entre las de adición de ácido se incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, como hidroclorehídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromhídrico, hidroyodhídrico, fosfórico y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos, como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, alcanóicos fenil-sustituídos, hidroxialcanóicos, aromáticos, sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinos y alcalinotérreos, como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, como N-N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

La composición puede presentarse en diversos formatos, que incluyen, por ejemplo, formas de administración sólida, semisólida y líquida, como soluciones líquidas (inyectables o por infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, pastillas, polvos, liposomas y supositorios. El formato de referencia depende del modo de administración y la aplicación terapéutica, aunque las más típicas son en forma de soluciones inyectables o de infusión, con composición similar a la utilizada para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración de referencia es parenteral (intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular), en forma óptima, por infusión o inyección intravenosa (por ejemplo, con inyección sin aguja). Otra forma óptima es por administración intramuscular o subcutánea.

Las frases “administración parenteral” o “administrada parenteralmente” designan, en este contexto, a modos de administración diferentes de la administración enteral o tópica, usualmente por inyección y que incluye, sin limitaciones, inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural o intraesternal.

Las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables durante la fabricación y almacenamiento, y puede formularse en solución, microemulsión, dispersión, liposomas, y otras estructuras ordenadas adecuadas para la preparación de altas concentraciones de compuestos. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el principio activo (anticuerpo o una parte del mismo) en una cantidad adecuada en un disolvente adecuado con uno o más de los ingredientes enumerados anteriormente, seguidos por filtración en condiciones de esterilidad. En el caso de polvos para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de referencia son el secado a vacío y el secado-congelado, de los que se obtiene un polvo del principio activo además de cualquier otro ingrediente adicional presente en la solución de partida. Se puede mantener un grado de fluidez adecuado empleando recubrimientos como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula en el caso de dispersiones y mediante el empleo de surfactantes. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo un compuesto que retarde la absorción, tales como una sal monoesteárica o gelatina.

Los agentes de unión al polipéptido de activación temprana pueden administrarse a través de una gran variedad de métodos descritos en la literatura, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta de administración de referencia es la inyección o infusión intravenosa. Como es lógico, la ruta de administración puede variar dependiendo de la consecución de los resultados deseados. En ciertas situaciones, el compuesto puede prepararse junto con un portador que impida la liberación rápida del compuesto, como formulaciones de liberación controlada que incluyen implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden emplear polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Se encuentran muchos ejemplos de tales formulaciones en la literatura (*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

En algunos casos se pueden administrar compuestos farmacéuticos de agentes de unión al polipéptido de activación temprana, solos o en combinación con otros agentes, tópicamente o mediante parches transdérmicos. En los casos en los que el agente de unión es una molécula de pequeño tamaño molecular se puede administrar oralmente. Además, los compuestos se pueden administrar parenteralmente, especialmente para el tratamiento de la artritis, artritis psoriática, y para la inyección directa en lesiones de la piel. La terapia parenteral es típicamente intradérmica, intraarticular, intramuscular o intravenosa. Los agentes de unión al polipéptido de activación temprana se pueden aplicar directamente junto con un portador en forma de crema o aceite, o en forma de aerosol, así como oralmente.

Los compuestos terapéuticos pueden administrarse mediante equipos médicos descritos en la literatura. Por ejemplo, un compuesto terapéutico de esta invención puede administrarse mediante un sistema de inyección hipodérmica sin aguja, como los descritos en las Patentes U.S. Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5, 312, 335, 5, 064, 413, 4, 941, 880, 4, 790, 824, o 4,596,556. Otros implantes y módulos útiles en la presente invención incluyen: Patente U.S. No. 4,487,603, que incluye una bomba implantable de microinfusión para administrar medicación a velocidad controlada; Patente U.S. No. 4,486,194, que incluye un instrumento terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente U.S. No. 4,447,233, que contempla una bomba de infusión de medicamentos a una velocidad de infusión precisa; Patente U.S. No. 4,447,224, que describe un aparato implantable de infusión de flujo variable para administración continua; Patente U.S. No. 4,439,196, que describe un sistema osmótico de administración de medicamentos con compartimentos multi-cámara; y Patente U.S. No. 4,475,196, que incluye un sistema de administración de medicamentos osmótico. Estas patentes se incluyen como referencia. Muchos otros implantes y sistemas de administración se han descrito en la literatura.

Los regímenes de administración se ajustan para optimizar la respuesta deseada (terapéutica u otras). Por ejemplo, se puede administrar un bolus único, o dosis divididas en el tiempo, o se puede incrementar o reducir la dosis de acuerdo con las exigencias de la situación terapéutica. La formulación de compuestos parenterales en forma dosificada es especialmente conveniente para facilitar la administración y conferir uniformidad en la administración. La unidad de dosis, como se describe aquí, se refiere a unidades físicamente discretas en dosis unitarias para el tratamiento de los sujetos; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de la unidad de dosis de esta invención está dictada por y es directamente dependiente de: a) Las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico particular que se desea alcanzar, y b) Las limitaciones inherentes descritas para componer un principio activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un rango ejemplar y no limitante de cantidad de anticuerpo o una porción del mismo terapéutica o profilácticamente efectivo está entre 0.1 y 20 mg/kg, preferiblemente entre 1-10 mg/kg. El anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana se administra por infusión intravenosa a, al menos, preferiblemente o igual a 5 mg/min para alcanzar una dosis de entre 1 a 100 mg/m², preferiblemente entre 5 y 50 mg/m², más óptimamente, entre 7 y 25 mg/m², sobre 10 mg/m². Hay que resaltar que las dosis pueden variar con el tipo o severidad de la condición terapéutica. Es de entender que, para una situación particular, es necesario ajustar regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo para adaptarse a las necesidades individuales y al juicio profesional de la persona que administra o supervisa la utilización de los compuestos, y que los rangos de dosificación explicitados anteriormente se emplean exclusivamente como ejemplo y no están encaminados a limitar el rango o práctica de los compuestos reivindicados.

Los compuestos farmacéuticos de esta invención pueden incluir una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “cantidad profilácticamente efectiva” de un reactivo de unión. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad efectiva, aplicada en dosis y durante períodos de tiempo requeridos para alcanzar el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo de unión al polipéptido de activación temprana puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, así como de la capacidad del anticuerpo o una porción del mismo de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva se define también como aquélla en la que cualquier efecto tóxico o negativo del reactivo de unión al polipéptido de activación temprana es sobrepasado por el efecto terapéutico beneficioso. Una “dosis terapéuticamente efectiva” inhibe, preferiblemente, un parámetro cuantificable en relación con sujetos no tratados. La capacidad del compuesto para inhibir un parámetro cuantificable puede medirse en un modelo animal de predicción de su eficacia en humanos. Alternativamente, esta propiedad de un compuesto puede evaluarse examinando la capacidad inhibitoria del compuesto, por ejemplo, en inhibición *in vitro*, en ensayos descritos en la literatura. Una “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere a la cantidad efectiva, en dosis adecuadas y durante un período de tiempo determinado, requerida para alcanzar un resultado profiláctico deseable. Típicamente, y dado que una dosis profiláctica se emplea en individuos en estadios tempranos de enfermedad, o incluso antes, la cantidad profilácticamente efectiva debe ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Usos

Los antagonistas y eliminadores del polipéptido de activación temprana aquí descritos o identificados por métodos aquí descritos pueden ser utilizados para tratar a un sujeto que tiene un desorden caracterizado por una respuesta inmune aumentada o disminuida. Por ejemplo, los antagonistas del polipéptido de activación temprana pueden emplearse para tratar a un sujeto que tenga un desorden caracterizado por una respuesta inmunitaria disminuida o a un sujeto que sin tener disminuido o comprometido su sistema inmune se puede beneficiar, de todos modos, de una respuesta inmune aumentada. Tales desórdenes incluyen aquellos caracterizados por procesos de proliferación celular no deseados, como el cáncer, o una inmunodeficiencia. Los métodos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista del polipéptido de activación temprana a un sujeto con un síndrome como el descrito anteriormente. También se puede prevenir la aparición de dichos desórdenes mediante la administración de una cantidad profilácticamente activa de un antagonista del polipéptido de activación temprana.

Por tanto, en algunos aspectos, los antagonistas del polipéptido de activación temprana pueden usarse para tratar o prevenir procesos de proliferación celular no deseados como el cáncer, mediante la inhibición del crecimiento o la eliminación directa de la célula hiperproliferativa. El antagonista del polipéptido de activación temprana puede disminuir la expresión y/o actividad del polipéptido de activación temprana, potenciando por tanto la inmunidad frente a tumores del sujeto. Por ejemplo, en sujetos con cáncer, p.e., leucemia linfática, p.e., leucemia linfática crónica B sin mutaciones en las inmunoglobulinas, aumenta la expresión de AICL (Klein *et al.* (2001) J. Exp. Med. 11:1625; Rosenwald *et al.* (2001) J. Exp. Med. 11:1639). Un antagonista de AICL, p.e., un antagonista bloqueante o que disminuya la expresión de AICL, puede usarse para disminuir la expresión o activación de AICL, por tanto aumentando la inmunidad en tales sujetos. Parece haberse demostrado que el antagonismo del polipéptido de activación temprana inhibe la síntesis de TGF- β . Dado que el TGF- β puede actuar como inmunosupresor, la inhibición de la producción de TGF- β permite que las células inmunes continúen inhibiendo el crecimiento o la proliferación de las células hiperproliferativas. Además, un eliminador de una molécula de activación temprana puede ser usada para tratar o prevenir tumores que expresen cánceres que expresan la molécula de activación temprana. Por ejemplo, un eliminador de AICL se puede usar para inhibir el crecimiento o la proliferación de las células que expresan AICL en sujetos que tienen leucemia linfática, p.e., leucemia linfática crónica B sin mutación en las inmunoglobulinas. Tal y como se emplea en el texto, la expresión “inhibir el crecimiento o proliferación” de una célula hiperproliferativa (célula neoplásica), se refiere al retardo, interrupción, bloqueo o detención de su crecimiento y capacidad metastásica, y no indica necesariamente una

eliminación total del crecimiento neoplásico. El empleo del término “inducir la muerte” de la célula hiperproliferativa (neoplásica), define la eliminación parcial o completa de dichas células, y no necesariamente la eliminación total del crecimiento neoplásico.

5 Los términos “inducir”, “inhibir”, “potenciar”, “elevar”, “incrementar”, “disminuir” y otros similares, que denotan diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren a, al menos, diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células sin tratamiento. Tales términos se emplean aquí para referirse, por ejemplo, a velocidades de proliferación celular.

10 Los términos “cáncer”, “hiperproliferativo” y “neoplásico” designan a aquellas células con capacidad de crecimiento autónomo. Como ejemplo de estas células, se pueden citar a aquellas que se encuentran en un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento celular y proliferación muy rápido. Las situaciones hiperproliferativas o neoplásicas pueden clasificarse en patológicas (caracterizando o constituyendo una enfermedad) y no patológicas (desviadas del comportamiento normal, pero no asociadas a un estado de enfermedad). Este término incluye todos
15 los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos en metástasis o células malignas transformadas, tejidos u órganos, sin tener en cuenta el tipo histopatológico o el nivel de invasión. Las células “patológicamente hiperproliferativas” aparecen en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento de tumores malignos. Por otra parte, como ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas, se pueden citar a las células involucradas en la reparación de heridas.

20 Por tanto, desde cierto punto de vista, un antagonista del polipéptido de activación temprana puede emplearse para tratar o prevenir desórdenes caracterizados por procesos de hiperproliferación no patológicos, como por ejemplo, desórdenes fibróticos. El desorden puede asociarse con uno o más de: traumatismo, cirugía, infección, polución ambiental, tabaco, alcohol u otras toxinas. El desorden se puede asociar con, por ejemplo, uno de los siguientes:
25 reparación hipereficiente de heridas (p.e., cicatrices hipertróficas, queloides), fibrosis renal (proliferación de células mesangiales), ó fibrosis hepática (proliferación de células estrelladas hepáticas). Ejemplos de desórdenes fibróticos incluyen: queloides, quemaduras, cicatrices hipertróficas u otros desórdenes de la piel (p.e., esclerodermia local o sistémica, p.e., esclerosis sistémica con esclerodermia), cirrosis hepática, fibrosis renal (p.e. relacionada con diabetes o hipertensión), adhesiones quirúrgicas (p.e. tras cirugía gastrointestinal o adhesiones de neocirugía), trasplantes vasculares, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por radiación, fibrosis relacionada con el asbesto (p.e. pulmón marrón o negro), fibrosis asociada con hepatitis viral, degeneración macular, retinopatía vitreal y retinal, y fibrosis asociada con síndrome respiratorio agudo. La fibrosis puede ser de tipo agudo o crónico. Ejemplos de fibrosis aguda incluyen: heridas accidentales, infecciones, cirugía, quemaduras, fibrosis inducida por radiación y fibrosis inducida por quimioterapia. La fibrosis crónica se puede asociar con, p.e., infecciones virales, diabetes e hipertensión.

35 Los términos “cáncer” o “neoplasma” designan procesos de malignización de diferentes sistemas de órganos, como los que afectan a los pulmones, mamas, glándula tiroidea, tractos gastrointestinal y genito-urinario, así como adenocarcinomas que incluyen síndromes malignos como la mayoría de los cánceres de colon, carcinomas de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinomas de pulmón de células grandes, cáncer de intestino delgado y de esófago.

El término “carcinoma” está reconocido en la literatura y se refiere a malignizaciones de tejido epitelial o endocrino, incluyendo carcinomas del sistema respiratorio, gastrointestinal, genitourinario, testicular, de mama, de próstata, del sistema endocrino y melanomas. Algunos ejemplos son aquellos que se forman a partir del tejido de cérvix, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello de útero, colon y ovarios. En la definición del término, se incluyen los carcinosarcomas, como aquéllos que están compuestos por tejido carcinomatoso y sarcomatoso. Un “adenocarcinoma” se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el cual las células tumorales forman estructuras glandulares de morfología reconocible. El término “sarcoma” está contemplado en la literatura y se refiere a tumores malignos derivados de tejido mesenquimal.

50 Algunos ejemplos de desórdenes proliferativos y/o de diferenciación incluyen el cáncer (por ejemplo, carcinomas, sarcomas, desórdenes metastásicos o desórdenes neoplásicos hematopoyéticos, como leucemias). Un tumor metastásico puede surgir a partir de una multitud de tipos de tumor primario, incluyendo, pero no limitándose a, aquellos de próstata, colon, pulmón, mama e hígado.

55 Otros ejemplos de cáncer o situaciones neoplásicas incluyen a los siguientes tipos de desórdenes y a los citados anteriormente, pero no se citan todos los existentes: fibrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendotelio-sarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cabeza y cuello de útero, cáncer de piel, tumores cerebrales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del tracto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cérvix, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, o sarcoma de Kaposi.

Existen ejemplos adicionales de desórdenes proliferativos, que incluyen desórdenes hematopoyéticos neoplásicos. En este contexto, el término “desórdenes neoplásicos hematopoyéticos” designan enfermedades que implican a células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético. Un desorden hematopoyético de estas características puede surgir a partir de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o precursores de los mismos. Habitualmente, estas enfermedades surgen como leucemias poco diferenciadas, como por ejemplo, la leucemia eritroblástica o megacarioblástica aguda. Otros ejemplos adicionales incluyen, pero no están limitados a: leucemia promieloide aguda (*acute promyeloid leukemia, APL*), leucemia mieloblástica aguda (*acute myelogenous leukemia, AML*) y leucemia mieloblástica crónica (*chronic myelogenous leukemia, CML*, revisada en Vaickus, L. (1991) *Crit Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); los tumores linfoides incluyen, pero no están limitados a, leucemia linfoblástica aguda (*acute lymphoblastic leukemia, ALL*) que incluye ALL de linajes B y T, leucemia linfocítica crónica (*chronic lymphocytic leukemia, CLL*), (p.e., leucemia linfocítica crónica T ó B, p.e., leucemia linfocítica crónica B con o sin mutación en las inmunoglobulinas), leucemia prolinfocítica (*prolymphocytic leukemia, PLL*), leucemia de células peludas (*hairy cell leukemia, HLL*) y la macroglobulinemia de Waldenstrom. Otras formas de linfoma maligno incluyen, pero no están limitadas a: linfomas no-Hodgkin y sus variantes, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (*adult T cell leukemia/lymphoma, ATL*), linfomas de células T cutáneas (*cutaneous T-cell lymphoma, CTCL*), leucemia de linfocitos grandes granulares (*large granular lymphocytic leukemia, LGL*), enfermedades de Hodgkin y de Reed-Sternberg.

Los antagonistas del polipéptido de activación temprana pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, como aquellos indicados en el tratamiento o prevención de procesos proliferativos no deseados. Estos agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, uno o más agentes quimioterapéuticos, radioisótopos y/o citotoxinas. Como ejemplos de agentes quimioterapéuticos se pueden citar taxol, citocalasina B, gramicidina D, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, busulfan, cisplatina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, clorambucil, gencitabina, actinomicina, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina, maytansinoides y análogos u homólogos de los anteriores. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a: antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, CC-1065, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiaminoplatino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente denominada daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente denominada actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxol y maytansinoides). Los radioisótopos pueden ser emisores alfa, beta y/o gamma, y como ejemplos, pueden incluirse los siguientes: ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{211}At , ^{186}Re , ^{90}Y y ^{117}Lu . El antagonista del polipéptido de activación temprana y los agentes terapéuticos pueden ser administrados simultánea o secuencialmente. Además, los antagonistas del polipéptido de activación temprana pueden administrarse conjuntamente con otras modalidades de tratamiento del cáncer, como cirugía para eliminar una parte o todo el tejido canceroso o el órgano que lo contiene.

Tal y como se emplean aquí, los términos “agente citotóxico”, “agente anticanceroso” o “agente antitumoral” se emplean indistintamente y se refieren a agentes que tienen la propiedad de inhibir el crecimiento o proliferación (por ejemplo, un agente citostático), o bien de inducir la muerte de las células hiperproliferativas. Preferentemente, el agente citotóxico inhibe el desarrollo o la progresión de los neoplasmas, particularmente tumores sólidos, tumores de tejido blando, lesiones metastásicas, linfomas o leucemias.

Una “cantidad terapéuticamente activa” de un agente, solo o en combinación con un agente citotóxico, se refiere a la cantidad de tales agentes en combinación efectiva en la inhibición del crecimiento o proliferación, o en la inducción de muerte de las células hiperproliferativas, en administración única o múltiple a un sujeto (un paciente). Tal inhibición del crecimiento o muerte celular puede reflejarse en la prolongación de la supervivencia de un sujeto (paciente), más allá de lo esperado en la ausencia de tal tratamiento, o cualquier mejora en la prognosis del sujeto con respecto a la ausencia de tal tratamiento.

Una “cantidad profilácticamente activa” de un agente, solo o en combinación con un agente citotóxico, se refiere a la cantidad de tales agentes en combinación efectiva en la prevención o retardo de la aparición de procesos de recurrencia de un desorden, por ejemplo, un desorden neoplásico.

Cuando se administra a pacientes en tratamiento contra el cáncer, el antagonista del polipéptido de activación temprana puede administrarse en cócteles que contengan otros agentes anti-cancerosos, y también pueden administrarse en cócteles destinados a tratar los efectos secundarios de la terapia de irradiación, como anti-eméticos, protectores contra la radiación, etc.

Los eliminadores de las células que expresan el polipéptido de activación temprana pueden emplearse para tratar a un sujeto que sufre un desorden caracterizado por una respuesta inmune incrementada o exacerbada. Tales desórdenes incluyen desórdenes crónicos inflamatorios y desórdenes inmunes, como enfermedades autoinmunes. Los métodos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un eliminador de células que expresan el polipéptido de activación temprana a un sujeto que padezca un desorden caracterizado por una respuesta inmunitaria incrementada.

Algunas enfermedades inflamatorias pueden ser tratadas empleando esta invención, entre las que se pueden citar: lesión pulmonar aguda, síndrome agudo de estrés respiratorio, artritis (por ejemplo, CIA), asma, bronquitis, fibrosis

cística, hepatitis, enfermedad inflamatoria de asas intestinales, esclerosis múltiple, lesión de reperusión (por ejemplo, de miocardio), nefritis, pancreatitis, psoriasis, oclusión de arterias (e.g., retinal), apoplejía, lupus eritematoso sistémico, trasplantes, daño inducido por luz ultravioleta, y/o vasculitis. La enfermedad inflamatoria puede ser crónica o aguda, y preferentemente mediada por leucocitos (ver revisiones de Weissmann *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 389:11-24, 1982; Janoff, A., *Annu. Rev. Med.* 36:207-216, 1985; Hart *et al.*, *J. Rheumatol.* 16:1184-1191, 1989; Doring, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:S114-S117, 1994; Demling, *Annu. Rev. Med.* 46:193-202, 1995). Las enfermedades con síntomas de inflamación crónica incluyen, pero no se limitan a: inflamación de asas intestinales, como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide.

Los antagonistas del polipéptido de activación temprana descritos aquí o identificados por alguno de los métodos descritos aquí pueden emplearse para incrementar la respuesta inmune a un antígeno, por ejemplo una vacuna, o un ácido nucleico que codifica para antígeno. Estos métodos incluyen la administración de un antígeno (vacuna) o un DNA que codifica para un antígeno y un antagonista del polipéptido de activación temprana, para incrementar la respuesta inmunitaria al antígeno por parte del sujeto.

Ejemplos de vacunas pueden incluir, vacunas frente al cáncer, vacunas frente al HIV, vacunas frente a la hepatitis, o a la malaria, o al herpes, o al papiloma, o a la gripe, o la viruela. Se han desarrollado varias vacunas frente al cáncer que podrían administrarse con un antagonista del polipéptido de activación temprana descrito aquí. Ejemplos de tales vacunas de cáncer incluyen, pero no se limitan a, vacunas de células tumorales autólogas; vacunas de células tumorales alogénicas; gangliósidos (p.e., para melanoma o sarcoma); CEA (p.e., para cáncer colorectal, u otros tumores gastrointestinales, cáncer de páncreas o de mama); PSA (p.e., para cáncer de próstata); MART-1 100, tirosinasa (p.e., para melanoma); p53 (para varios tumores que expresen p53); alfa-fetoproteína (AFP) (p.e., para cánceres de hígado, tales como los hepatomas).

El antagonista del polipéptido de activación temprana puede administrarse al sujeto antes, al mismo tiempo o posteriormente a la administración del antígeno.

Ejemplos de la patente

Para examinar el papel *in vivo* de CD69 en la reactividad autoinmune y la inflamación, se analizó el comportamiento de la AIC en ratones deficientes en CD69 de la cepa B6. Se observó una forma exacerbada de AIC en los ratones deficientes para CD69 que correlacionó con respuestas T y B específicas frente a colágeno tipo II (CII) aumentadas, aumento en algunos mediadores pro-inflamatorios y disminución local en la síntesis de TGF- β . El bloqueo local de TGF β aumentó la gravedad de la AIC en ratones WT pero no en los deficientes para CD69. Además, la activación de CD69 *in vitro* indujo la producción de TGF β 1. Estos resultados sugieren fuertemente que CD69 es un regulador negativo de la reactividad autoinmune a través de la síntesis de TGF β . También se describe el aumento de la respuesta antitumoral dependiente de células NK en ratones deficientes para CD69. La deficiencia en CD69 resulta en una mayor protección y rechazo de células tumorales MHC-I comparando con ratones control. Esta potente respuesta antitumoral es dependiente del microambiente tumoral en el huesped, correlacionando con una disminución en la producción de TGF- β , un incremento en los perfiles de citocinas inflamatorias y la quimiocina MCP-1, y se asocia a un incremento del reclutamiento de células linfoides efectoras y disminución de la apoptosis. Este incremento en la actividad antitumoral es dependiente de células NK y linfocitos T y persiste en ratones inmunodeficientes CD69^{-/-}, RAG-negativos. Más aún, el tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-TGF- β induce la potenciación de la respuesta antitumoral. Por otra parte, la activación de CD69 induce la fosforilación de ERK y la producción de TGF- β en linfocitos T, producción que se inhibe por el tratamiento de los linfocitos T con un inhibidor específico de MEK1, una quinasa que fosforila y activa ERK, lo que constituye un nexo entre la señalización por CD69 y la producción de TGF- β . También se presentan evidencias de que el tratamiento *in vivo* con el anticuerpo antagonista contra CD69 2.2 mejora la respuesta antitumoral en ratones normales e inmunodeficientes de cepas SCID y RAG-negativas inducidas con tumores negativos para MHC de clase I.

Estos resultados indican que CD69 es un regulador negativo de la reactividad inmunitaria a través de la síntesis de TGF- β . El tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-CD69 depende del anticuerpo empleado. El antagonista 2.2 potencia la respuesta inmune, aumentando la gravedad de la AIC pero incrementando también la eficiencia del rechazo tumoral, mientras que el eliminador 2.3 erradica los leucocitos efectoras, mejorando los parámetros clínicos de la AIC. Además, este anticuerpo puede eliminar directamente los tumores CD69⁺.

Los siguientes ejemplos ilustran la patente propuesta y no han de considerarse como una limitación de los hallazgos incluidos en este informe:

Ejemplo 1

Los ratones deficientes en CD69 desarrollan una exacerbación de la AIC

Para explorar el papel de CD69 en un modelos de artritis crónica autoinmune, se han comparado la incidencia y gravedad de la AIC inducida por inmunización intradérmica de CII en CFA en ratones de la cepa B6 (en los que este protocolo induce una artritis moderada (Campbell *et al.*, 2000)), empleando animales control (CD69^{+/+}) y CD69^{-/-} (Lauzurica *et al.*, 2000). Los ratones desarrollaron una forma exacerbada de AIC, mostrando una marcada hinchazón de la pata, articulaciones del tobillo e interdigitantes (Fig. 1A), y un aumento en la gravedad e incidencia comparado

con ratones control (Fig. 1B). Los heterocigotos CD69^{+/-}, que expresan niveles intermedios de CD69 (Lauzurica *et al.*, 2000), mostraban agravamiento de la AIC, pero sensiblemente menor que los homocigotos CD69^{-/-} (Fig. 1B).

Para evaluar con mayor profundidad la artritis, secciones teñidas con hematoxilina y eosina de las extremidades de ratones WT y CD69^{-/-} con diferentes grados de AIC fueron analizados por examen histológico. Los resultados de estos estudios coincidieron con los de la valoración clínica, con un porcentaje significativamente mayor de extremidades con patología severa que se observaron en los ratones deficientes para CD69, comparados con los ratones WT (Fig. 2A). Las extremidades de los ratones CD69^{-/-} mostraban una mayor incidencia de infiltrados de células inflamatorias, con pannus extendiéndose desde las zonas marginales al cartílago y a través de la médula del hueso subcondral (Fig. 2A y 2B). En estadios más tardíos, se observó destrucción del cartílago articular y el hueso, con pérdida de la normal morfología de la articulación. Por lo tanto, estos resultados demuestran una clara correlación inversa entre la gravedad de la AIC y la expresión de CD69, sugiriendo un papel inhibitorio *in vivo* para CD69 en el desarrollo de la AIC.

Ejemplo 2

Potenciación de la respuesta inmune específica contra el CII en ratones CD69^{-/-}

Estos resultados sugieren que el CII induce una respuesta inmunitaria exacerbada en los ratones deficientes en CD69. De acuerdo con esto, el bazo de los ratones CD69^{-/-} en los que se ha inducido AIC eran de mayor tamaño (sobre unas 1.4 veces más pesado, $p < 0.001$, test t Student) que los ratones control de 12 semanas de edad (Fig. 3A, B). El incremento del peso de los bazos correlaciona con un aumento en el número de células (Fig. 3B). A continuación, determinamos si el incremento en la celularidad se debía a alguna diferencia en alguna de las subpoblaciones de células inmunes presentes en el bazo. La proporción de células T, B, macrófagos, y células NK, así como la proporción CD4/8 y células naïve/efectoras-memoria (CD62L/CD44) y la población de células T reguladoras CD45RB bajo, CD25+, CD4+ se analizaron. La proporción de estos grupos se conservó entre los WT y los ratones CD69^{-/-} tanto en la ausencia de estimulación como tras la inmunización con CII. Para determinar la capacidad de activación de los linfocitos, se analizó la respuesta linfoproliferativa en respuesta a CII en linfocitos del bazo o de nódulos linfoides. Los linfocitos de los ratones CD69^{-/-} mostraron mayores niveles de proliferación de manera dependiente de dosis cuando se comparan con los ratones control (Fig. 3C), indicando un efecto inhibitorio de CD69 en la proliferación específica frente a CII por parte de células inmunes procedentes de un ratón inmunizado *in vivo* con CII.

También se estudió la respuesta humoral frente a CII. La concentración sérica de anticuerpos contra CII y su caracterización isotípica reveló mayores niveles del isotipo IgG2c, dependientes de la respuesta Th1, y que es el equivalente en la cepa de ratones B6 a las IgG2a e IgG2b (Fig. 3D). También se demostró un incremento significativo de IgG3, lo que indica una hiperrespuesta de los linfocitos B de los ratones CD69^{-/-}, mientras que la reducción en IgM sugeriría un cambio potenciado a IgG. La IgG1, dependiente de respuesta Th2, no fue significativamente diferente, y CII no indujo una respuesta de IgA sérica. Estos resultados sugieren la potenciación de la reactividad inmune tanto T como B en los ratones deficientes para CD69.

Ejemplo 3

Los ratones deficientes para CD69 producen localmente menos TGF- β

El proceso inflamatorio y el desarrollo de la artritis involucra a un amplio abanico de citocinas (Feldmann *et al.*, 1996; O'Shea *et al.*, 2002). Puesto que las articulaciones son el lugar más relevante de producción de citoquinas en artritis, se investigó el efecto de la deficiencia en CD69 en el perfil de citocinas expresadas en las articulaciones de los ratones que padecen AIC. Empleando ensayos de protección frente a actividad RNasa, se demostró que la deficiencia en CD69 produce un incremento en la expresión de algunos mediadores inflamatorios como IL-1 β , RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (Fig. 4). No obstante, la diferencia más significativa es la reducción de los niveles de la citocina antiinflamatoria TGF- β 1 y TGF- β 2 en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 4). El análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real de los mRNA de las patas traseras de los ratones demostró la reducción en el mRNA de TGF- β 1 presente en las articulaciones inflamadas y el incremento en IL-1 β y RANTES (Fig. 5A).

Después, los niveles de TGF β 1 total y activo, directamente producido por leucocitos activados (Kehr *et al.*, 1986), y otras citoquinas en lavados de tejido articular se analizaron. Se demostró que tanto los niveles totales de TGF- β como la fracción activada de esta citocina se hallan disminuidos en los ratones deficientes para CD69 (Fig. 5B), en contraste con los niveles sistémicos de la misma, en los que no se observó diferencias (datos no mostrados). Por otra parte, se observó un incremento local de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y RANTES en las articulaciones afectadas, mientras que los niveles de TNF- α no mostraban diferencias significativas (Fig. 5B). Dado que el TGF- β se considera una citocina anti-inflamatoria que protege en modelos de AIC (Kuruvilla *et al.*, 1991), estos resultados sugieren que la deficiencia en la producción de TGF- β 1 puede originar el incremento en la respuesta inflamatoria observada en los ratones CD69^{-/-} a través de la elevación de la producción de IL-1 β y diversas quimiocinas, alterando así el equilibrio entre citocinas pro- y anti-inflamatorias en el sinovio (15).

Posteriormente, se investigaron las poblaciones celulares responsables del perfil de expresión de citocinas observado en los ratones CD69^{-/-}. La purificación de las poblaciones sinoviales demostraron que estas células son en su mayor parte macrófagos CD11b⁺ (66.3 \pm 29.4%), con algunas células CD3⁺ (9.6 \pm 5.3%), y células no leucocitarias

CD45⁻ (24.1 ± 14.8%). Se aislaron estas tres poblaciones, y se demostró que tanto las poblaciones CD11b⁺ como CD3⁺ contribuyeron a la disminución local del TGF- β en los ratones deficientes para CD69. No obstante, se demostró que la subpoblación CD11b⁺ causaba el posterior incremento de la respuesta proinflamatoria mediada por la IL-1 β (Fig. 5C), lo que le confiere un papel crucial en la perpetuación de la sinovitis.

Ejemplo 4

El bloqueo del TGF- β aumenta la severidad de la AIC en ratones control pero no deficientes en CD69

Los efectos protectores de TGF β 1 en la AIC pueden explicar por sí mismos la desregulación del equilibrio de algunas citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (O'Shea *et al.*, 2002; Kuruvilla *et al.*, 1991; Brandes *et al.*, 1991). Estos resultados explicarían la mayor infiltración de leucocitos y las respuestas inflamatorias de los ratones deficientes para CD69. Para establecer un nexo causal entre los niveles de TGF- β y la gravedad de la AIC, se inyectó localmente en las patas de los ratones con AIC un anticuerpo bloqueante contra TGF- β (Dasch *et al.*, 1989). El bloqueo del TGF- β indujo un aumento significativo en la inflamación de la pata comparado con un control de isotipo o el diluyente (Fig. 6A). El análisis del mRNA de la articulación por RT-PCR cuantitativa demostró una inducción significativa de IL-1 β y RANTES, pero no de TNF- α o IL-18 (Fig. 6A). Estos resultados demuestran que el bloqueo del TGF- β en los ratones control con AIC resultan en un fenotipo similar al observado en los ratones CD69^{-/-}. Sin embargo, la inyección local del anticuerpo contra TGF- β en los ratones deficientes en CD69 con AIC no incrementó la inflamación de la pata (Fig. 6B), y el análisis de mRNA no demostró ninguna modificación apreciable en los niveles de las citocinas proinflamatorias estudiadas. Estos hallazgos revelan que el bloqueo del TGF- β y la deficiencia de CD69 no cooperan para agravar la AIC, sugiriendo su interdependencia.

Ejemplo 5

Inducción de la expresión de TGF- β 1 por activación de CD69

Para analizar el posible papel modulador de CD69 en la síntesis de TGF- β 1, se investigó la secreción de dicha citocina en esplenocitos de ratón estimulados con Con-A. El entrecruzamiento de CD69 indujo un marcado incremento en los niveles de TGF- β total y activo en diferentes subgrupos de leucocitos (Fig. 7A), de acuerdo con los datos encontrados en células NK y en esplenocitos activados con anti-CD3 {Esplugues}. Además, el entrecruzamiento de CD69 indujo la producción de TGF- β 1 en células de infiltrado sinovial de ratón, la mayoría de las cuales eran CD11b⁺ CD69⁺ (Fig. 7B). En cambio, no se detectaron cambios en la expresión de TNF- α , RANTES o IL-1 β tras la activación de CD69 (datos no mostrados).

Para investigar la posible extensión de estos resultados a los humanos, se analizó la expresión de TGF- β 1 en células mononucleares CD69⁺ procedentes de las articulaciones de pacientes con enfermedades inflamatorias (Fig. 8A). El anticuerpo TP1/8 anti-CD69 entrecruzado (pero no soluble) indujo la expresión de TGF- β sin otro coestímulo (Fig. 8A), mientras que no se observaron diferencias en otras citocinas, como TNF- α o IL-6 (datos no mostrados). En estos ensayos, el incremento en TGF- β activo correlacionaba con el incremento en los niveles totales de la citocina (Fig. 7 y 8). Estos resultados demuestran que, tanto en humanos (Fig. 8) como ratones (Fig. 7), existe un nexo directo entre la activación de CD69 y la expresión de TGF- β 1, lo que podría explicar los niveles aumentados de TGF- β 1 observados en los ratones CD69^{+/+} comparados con los CD69^{-/-}.

Para establecer una conexión directa entre el entrecruzamiento de CD69 y la producción de TGF β 1, usamos una línea Jurkat transfectada de manera estable con CD69 humano (JK-CD69). La línea JK-CD69 que expresa CD69 produjo significativa síntesis de TGF- β activa tras el entrecruzamiento con anti-CD69, en contraste con la ausencia de síntesis de TGF- β en la línea parental Jurkat negativa para CD69 (Fig. 8B). Además, nuestros datos muestran que el entrecruzamiento de CD69 no indujo la producción de TNF (Fig. 8B). Estos resultados sugieren que CD69, un receptor inducido durante la activación, es capaz de modular la respuesta inmunológica y la reacción inflamatoria a través de la secreción directa de TGF- β 1 en el foco inflamatorio.

Ejemplo 6

*Tratamiento *in vivo* de la AIC con anticuerpos contra CD69*

El efecto del tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-CD69 se ha analizado empleando dos anticuerpos diferentes contra CD69, el anticuerpo monoclonal (mAb) 2.2 y el mAb 2.3, en el modelo de AIC en ratones DBA1.

El anticuerpo anti-CD69 2.2 (IgG1) es un anticuerpo no eliminador. Como IgG1, es incapaz de unir complemento y no elimina células que expresan CD69 en un ensayo *in vitro* con Cr⁵¹ (no mostrado). Más aún, el mAb 2.2 no induce síntesis de TGF- β *in vitro* en la ausencia de entrecruzamiento (Esplugues *et al.* 2002. J. Exp. Med. 197:1093; Sancho *et al.*, 2003. J. Clin. Invest. 112:872).

El efecto del anticuerpo anti-CD69 de ratón 2.2 se analizó *in vivo* en un modelo de AIC en ratones DBA/1. El tratamiento *in vivo* con este anticuerpo lleva a la completa pérdida de expresión de CD69 en poblaciones que expresan la molécula, tales como timocitos CD3hi (Fig. 19). Como se muestra en cuadrante derecho superior del panel izquierdo, el 14.2% de los timocitos expresan CD69. Tras el tratamiento con el mAb 2.2, sólo el 0.9% expresan

CD69 (panel derecho, cuadrante superior derecho). Sin embargo, el subconjunto de los timocitos CD3hi permanece constante, puesto que la suma de los cuadrantes superiores en cada panel es la misma, es decir 20.7% (6.5 + 14.2 para el tratamiento con control de isotipo y 19.8 + 0.9 para el tratado). Esto muestra que el mAb 2.2 no media la depleción de las células CD69+ *in vivo*. Estudios más profundos muestran que el mAb 2.2 reduce la expresión en membrana de CD69, es decir, antagoniza por modulación negativa de CD69.

El tratamiento de los ratones DBA/1 en el modelo de AIC con el mAb 2.2 exacerbó significativamente la enfermedad cuando se administró a los días 20 y 28 durante el inicio de la respuesta secundaria (Fig. 20), de acuerdo con nuestros datos en el ratón deficiente en CD69 (Fig. 1).

Los análisis de mRNA de las patas traseras por RT-PCR cuantitativa en ratones AIC tratados con control de isotipo y con anti-CD69 mAb 2.2 mostraron que los niveles de IL-1 β estaban aumentados (25.0 ± 9 a 58.4 ± 8 unidades, respectivamente; $p < 0.01$, test U Mann Whitney) y TGF- β 1 estaba disminuido (56.5 ± 13 a 18.2 ± 8 unidades, respectivamente; $p < 0.01$, test U Mann Whitney). Los niveles de IL-4, TNF, MCP1 e IFN- γ mRNA no variaban ($n=12$ ratones por grupo en dos experimentos independientes). Los resultados para cada citoquina se normalizan para la expresión de GAPDH medidas en paralelo en cada muestra. Los resultados muestran que la modulación negativa de CD69 por el mAb 2.2 lleva a la disminución del mRNA de TGF- β 1 y al aumento del mRNA para IL-1 β , de acuerdo con la exacerbación de la inflamación observada.

El anticuerpo monoclonal (mAb) 2.3 se comporta *in vitro* como un anticuerpo eliminador. Como IgG2a, se une a complemento y elimina células que expresan CD69 en un ensayo *in vitro* de liberación de Cr⁵¹ (no mostrado).

El efecto del mAb 2.3 se analizó *in vivo* en un modelo de AIC en ratones DBA/1. El tratamiento *in vivo* con este anticuerpo lleva a la depleción de los timocitos CD3hi que expresan CD69 (Fig. 21). Como se muestra en el cuadrante superior derecho del panel izquierdo, en este experimento el 16.7% de los timocitos expresa CD69. Tras el tratamiento con mAb 2.3, sólo el 0.1% expresa CD69 (cuadrante superior derecho, panel derecho). Sin embargo, el conjunto de timocitos totales CD3hi, que expresan CD69, está fuertemente reducido, puesto que las sumas de los paneles superiores son ahora diferentes, 24.8% en el control, pero sólo 8.3% en el grupo tratado. Esto muestra que el mAb 2.3 ha eliminado todas las células que expresan CD69, más que realizar un bloqueo funcional de la molécula.

El tratamiento de los ratones DBA/1 inducidos con AIC con mAb 2.3 redujo significativamente la AIC cuando se administró a días 20 y 28 durante el inicio de la respuesta secundaria (Fig. 22).

Estos resultados muestran que el tratamiento con un anti-CD69 que produzca modulación negativa de CD69 puede ser útil para potenciar ciertas respuestas inmunes. En contraste, la eliminación de células que expresan CD69 puede mejorar enfermedades mediadas por la activación del sistema inmune.

Ejemplo 7

Los ratones deficientes para CD69 desarrollan una respuesta antitumoral potenciada

Para evaluar el posible papel de CD69 *in vivo* en la respuesta antitumoral, se inyectaron intraperitonealmente células tumorales RMA-S en ratones control y CD69^{-/-}, y se analizó la progresión tumoral (Fig. 9A). Tras la inyección de 10⁴ células RMA-S, todos los ratones control desarrollaron tumores a las cinco semanas, con un incremento significativo del peso corporal observable a los 15 días, mientras que tan sólo un 20% de los ratones CD69^{-/-} desarrollaron tumores, lo que se verificó hasta 7 semanas post-inoculación (Fig. 9A). Se obtuvieron resultados semejantes cuando se inyectaron 10⁵ células RMA-S subcutáneamente (Fig. 9B), lo que demuestra que las diferencias observadas no se deben al lugar de inoculación. En cambio, se observaron diferencias muy sutiles en la progresión de tumores derivados de la línea celular RMA (H-2⁺) entre ratones control y CD69^{-/-} (Fig. 9C, y datos no mostrados), sugiriendo que los linfocitos citotóxicos (CTL) CD8⁺ desempeñan un papel accesorio en la potenciación de la respuesta antitumoral observada en los ratones CD69^{-/-}.

Estudios previos han demostrado que el crecimiento de los tumores RMA-S se controlan *in vivo* mediante las células NK en ratones normales (Smyth *et al.*, 1998). Para investigar la implicación de las células NK en el desarrollo de tumores RMA-S en ratones deficientes para CD69, se eliminaron estas células antes de la inducción del tumor mediante el tratamiento con un antisuero contra Asialo-GM1. Se inoculó este antisuero los días -1 (antes de la inducción del tumor), +2 y +4, empleándose el diluyente como control. Como se espera, se observó crecimiento tumoral en todos los animales en los que se había eliminado la población NK, pero en ninguno de los controles (Fig. 9D). Los ratones tratados con el anti-Asialo-GM1 desarrollaron tumores en los 10 primeros días post-inoculación, datos comparables con la inducción tumoral más temprana, observada en ratones C57BL/6 deficientes para perforina (Smyth y Johnstone, 2000; Smyth *et al.*, 1998). La eliminación de los linfocitos CD4⁺ en los ratones CD69^{-/-} aumentó el desarrollo tumoral, pero de forma menos acusada que en ratones sin células NK (Fig. 9D). Estos resultados indican que, aunque las células NK son muy importantes en el rechazo de tumores RMA-S en ratones deficientes para CD69, los linfocitos T también desempeñan un papel en este proceso. De acuerdo con el papel relevante de las células T en la supresión de tumores en ratones CD69^{-/-} se observó un control mayor en el sobrecrecimiento de las células RMA tras tres días de inoculación (datos no mostrados).

La potenciación de la actividad antitumoral observada en los ratones CD69^{-/-} no se restringía a las células RMA-S, ya que también se observó en el caso de inoculación de las células RM-1, un carcinoma de próstata singénico de C57BL/6 (MHC-I⁻CD69⁻). Se observó un descenso en el número de metástasis tumorales en los ratones deficientes para CD69 cuando se inyectaron 10⁴ células RM1 por vía intravenosa, mientras que los ratones control mostraron un

Ejemplo 8

Potenciación de la respuesta antitumoral en ratones CD69^{-/-} RAG-deficientes

Para analizar la contribución de la inmunidad natural a la potenciación de la respuesta antitumoral observada en los ratones deficientes en CD69, se inyectaron intraperitonealmente células RMA-S en ratones CD69^{-/-} RAG-deficientes y CD69^{+/+} RAG-deficientes (Fig. 10). Las células tumorales se sobrecrecieron en prácticamente todos los ratones RAG-deficientes en respuesta a 10⁶ celular RMA-S, mientras que los CD69^{-/-} RAG-deficientes controlaron el crecimiento tumoral casi completamente (Fig. 10A, B).

Ejemplo 9

Potenciación de la respuesta inmunitaria en ratones CD69^{-/-}

Se investigó si el rechazo tumoral estaba asociado con un incremento en la función de las células NK determinándose la actividad lítica *in vitro* de las células peritoneales de ratones CD69^{-/-} y control estimulados con células RMA-S, empleándose como diana la línea tumoral YAC-1, susceptible a NK. Se demostró que las células peritoneales sin fraccionar procedentes de los ratones CD69^{-/-} eran más eficaces destruyendo a las células YAC-1 que aquéllas procedentes de ratones control (Fig. 11A), demostrándose una correlación entre la respuesta NK *in vivo* y la citotoxicidad NK *in vitro* en los ratones CD69^{-/-}. Se obtuvieron resultados semejantes inoculando a los ratones con celular RM-1 (Fig. 11B). A continuación, se cuantificaron los linfocitos T y las células peritoneales procedentes de ratones inoculados con células RMA-S, RM-1 o sin inocular. Se estableció la población NK peritoneal como positiva para los anticuerpos DX5 y 2B4 por citometría de flujo. Como se demuestra en la Fig. 11C y en la tabla 1 se encontró un modesto incremento en el número total de células peritoneales en ratones CD69^{-/-} comparados con ratones control, lo que parecía deberse a un incremento en el número y proporción de los linfocitos, específicamente células NK y linfocitos T CD3⁺. Cuando se emplearon células RM-1, el número total de células reclutadas al peritoneo era significativamente mayor en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 11D). Esto refleja un incremento de casi tres veces en los números de células NK y linfocitos T CD3⁺ (Fig. 11). En cambio, el número de linfocitos CD5⁺B220⁺ B-1 y CD5⁺B220⁺ B-2 era similar en los ratones CD69^{-/-} y control, tanto en condiciones basales como tras el desafío con células RM-1 (datos no mostrados). También se detectó un modesto incremento en los niveles de monocitos y granulocitos del peritoneo de los ratones CD69^{-/-} (Fig. 11A). Además, la reducción en el reclutamiento celular observado en ratones control en el día 6 post-inoculación de las células tumorales no se observó en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 10C). Estos datos demuestran la existencia de una correlación entre el número de células NK y linfocitos T CD3⁺ en el peritoneo de los ratones CD69^{-/-} y la actividad antitumoral. Por tanto, CD69 parece regular el número de células NK y linfocitos T CD3⁺ reclutados al sitio de formación del tumor.

El bazo es un órgano linfoide fuertemente influenciado por la inflamación peritoneal. De acuerdo con esto, los bazos de los ratones CD69^{-/-} son mucho más grandes comparando con ratones control (Fig. 11D). El recuento de células esplénicas confirmó estos resultados, pero el análisis por citometría de flujo de las distintas subpoblaciones demostró la existencia de proporciones similares de linfocitos B220⁺, CD3⁺ y DX5⁺. Todo lo anteriormente expuesto sugiere un papel para CD69 como regulador de la acumulación linfocitaria en los sitios de inflamación.

(Tabla pasa a página siguiente)

Recuento de células en ratones inducidos con células tumorales RM-1 y no inducidos (basal)

Tabla 1. Peritoneo				
	Células totales (x10 ⁶)	% Células NK ^b	Totales NKS (x10 ⁴) ^c	% Células CD3 ⁺ ^d
Basal				
CD69 ^{+/+}	3.29 ± 0.08	0.96 ± 0.07	3,15	8.36 ± 1.04
CD69 ^{-/-}	4.01 ± 0.12	1.64 ± 0.10	6,57	14.60 ± 0.65
RM-1 (3 días)				
CD69 ^{+/+}	6.24 ± 0.90	2.50 ± 0.21*	15,6	12.75 ± 0.57
CD69 ^{-/-}	11.39 ± 1.28	3.51 ± 0.31	39,97	18.42 ± 0.89
Tabla 1A Bazo				
	Basal ^f	RM-1 (3 días) ^g	RM-1 (6 días) ^h	
Células totales (10 ⁶)				
WT	63.78 ± 5.12*	68.4 ± 4.54	85.52 ± 7.09	
KO	96.71 ± 10.94	121.25 ± 11.25	139.87 ± 7.68	
Peso de Bazo (mg)				
WT	54.58 ± 2.63	61.85 ± 2.87	89.29 ± 6.61	
KO	75.84 ± 4.81	87.54 ± 4.24	123.67 ± 7.34	

Los datos representan la media ± DE de tres experimentos diferentes. El valor de p fue <0,005 excepto *, p=0.02

- a Basal (n=7); RM-1 3d (n=11)
- b Basal (n=10); RM-1 3d (n=16)
- c Total NK = % Células NK X N° Células totales(x10⁶)
- d Basal (n=4); RM-1 3d (n=12)
- e N° células Totales CD3+ = % Células CD3+ X N° de células totales (x10⁶)
- f N° células totales (n=6); Peso de bazo (n=12)
- g N° células totales (n=4); Peso de bazo (n=14)
- h N° células totales (n=10); Peso de bazo (n=10)

Ejemplo 10

Aumento de la supervivencia linfocitaria de los ratones CD69^{-/-}

La expansión y eliminación de las células activadas se lleva a cabo mediante mecanismos homeostáticos en la circulación periférica (Krammer, 2000). Para investigar el mecanismo por el cual se observa acumulación linfocitaria en el bazo y peritoneo de los ratones CD69^{-/-}, se analizó la supervivencia de los linajes linfoides en estos ratones. Cuando se investigó la viabilidad celular *in vitro*, se observó un incremento en la supervivencia celular en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 12A). Se observó una diferencia significativa del 19% de disminución ($p < 0.02$) de apoptosis espontánea, determinada por contenido de DNA en ensayos de ciclo celular (24 h), de los linfocitos del bazo de ratones CD69^{-/-} en los que se han inyectado células RM-1 ($23.36 \pm 1.73\%$, $n=9$) con respecto a ratones control igualmente inoculados ($28.89 \pm 1.18\%$, $n=9$). El empleo de un ensayo de actividad caspasa-3 confirmó un descenso significativo ($p < 0.0001$) en la apoptosis espontánea (48 h) de los linfocitos del bazo de ratones CD69^{-/-} inoculados con células RM-1 ($25.46 \pm 0.5\%$, $n=6$) vs. ratones control ($44.56 \pm 1.3\%$, $n=6$) (Fig. 12B), diferencias que se reprodujeron ($p < 0.0001$) empleando células NK purificadas (DX5+CD3-) de ratones CD69^{-/-} ($35.26 \pm 1.6\%$, $n=4$) y control ($45 \pm 1.8\%$, $n=4$). Por tanto, parece que las diferencias en la supervivencia linfocitaria pueden contribuir al incremento en el tamaño de los bazos y celularidad observable en el peritoneo de los ratones CD69^{-/-}.

Ejemplo 11

Reducción en los niveles de TGF- β e incremento de factores proinflamatorios en los ratones CD69^{-/-}

La respuesta antitumoral está controlada por un amplio abanico de factores de crecimiento y citocinas, y la expresión alterada de los mismos puede tener un enorme impacto en las respuestas inmunitarias. Por lo tanto, se ha analizado si la potenciación de la respuesta antitumoral de los ratones CD69^{-/-} está influenciada por diferencias en los niveles de citocinas y/o quimiocinas, lo que se estudió mediante experimentos de protección de RNasa. El análisis del mRNA de las células peritoneales de ratones CD69^{-/-} en los que se ha inoculado células RM-1 mostró una variación en los niveles de la citocina TGF- β con respecto al control. Las células peritoneales de los ratones CD69^{-/-} producían menos transcritos de TGF- β 1, - β 2 y - β 3 que las células procedentes de ratones normales. Las disminuciones observadas en cuatro experimentos independientes oscilaban entre un $33 \pm 5\%$ para TGF- β 1 hasta un $74 \pm 19\%$ para el TGF- β 3. La disminución del TGF- β 2 era dependiente del sexo de los animales, variando de un 20% en machos hasta un 110% en hembras. El análisis de otras citocinas reveló un aumento de los niveles de IL-12p35 (32-68%), IL-1 α (27-64%), IL-1 β (32% en los machos, 294% en las hembras) y MCP-1 (133%) en los ratones CD69^{-/-} comparados con los ratones control (Fig. 13). No se observaron cambios significativos en los perfiles de expresión de LT- β , IFN- γ , MIF, IL-1R α , IL-18, eotaxina, MIP-1 α , MIP-1 β e IP-10 (Fig. 13 y datos no mostrados). Por tanto, estos resultados sugieren que las células inmunes de los ratones CD69^{-/-} poseen un perfil anormal de expresión de citocinas, con síntesis defectiva de factores inmunosupresores y elevada producción de citocinas proinflamatorias y la quimiocina MCP-1. Se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de la expresión de MCP-1, midiendo la secreción de dicha quimiocina por parte de las células peritoneales estimuladas con LPS de ratones inducidos con tioglicolato. Como se muestra en la Fig. 13B, los niveles de MCP-1 producidos por las células peritoneales de los ratones CD69^{-/-} eran casi tres veces mayores que los niveles de los ratones control. Estos cambios pueden dar cuenta de la potenciación de la respuesta inmune y el enriquecimiento en linfocitos T y células NK observados en los ratones CD69^{-/-}.

Ejemplo 12

Efecto del bloqueo del TGF- β en la respuesta antitumoral en ratones normales

Para examinar si la disminución en los niveles de TGF- β puede corresponder con el incremento en la respuesta antitumoral observada en los ratones CD69^{-/-}, se trataron ratones control con un anticuerpo monoclonal bloqueante del TGF- β . Dicho bloqueo previno el desarrollo de tumores comparado con el empleo de un anticuerpo control o el diluyente (Fig. 14). Estos resultados indican que el bloqueo del TGF- β en ratones en los que se han inoculado células tumorales da lugar a un fenotipo similar al observado en los ratones CD69^{-/-}.

Ejemplo 13

CD69 induce la secreción de TGF- β

Se examinó si la señalización por CD69 está implicada en la expresión del TGF- β en linfocitos T. La estimulación de células T purificadas de bazos de ratones B6 con un anticuerpo contra CD3 indujo una alta expresión de CD69 (Fig. 15A), cuyo entrecruzamiento resultó en una inducción de la producción de TGF- β (Fig. 15B). Este efecto no se observaba empleando un control de isotipo, lo que indica que el entrecruzamiento de CD3 no induce la secreción de TGF- β , como se ha descrito previamente (Chen *et al.*, 2001). La cuantificación de las células viables y no viables a las 48 horas (Fig. 15C) demostró una disminución en la supervivencia linfocitaria, lo que correlaciona con mayores niveles de TGF- β .

La estimulación de CD69 en líneas celulares maduras transfectadas induce la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (Zingoni *et al.*, 2000). Para determinar las cascadas de señalización de CD69 que regulan la expresión del TGF- β se analizó la activación de ERK. El entrecruzamiento de CD69 indujo la activación de

ERK-1 y ERK-2 en linfocitos T estimulados con anti-CD3 (Fig. 15D). La activación de ERK se detectaba a los 5 min, siendo máxima a los 15 min. Además, se observó una reducción significativa en la expresión de TGF- β inducida por CD69 cuando las células se pretrataban con el inhibidor de MEK1, PD98059 (Fig. 15B), indicando que la activación de ERK es importante para la producción de TGF- β inducida por CD69. Estos resultados establecen un nexo causal entre la señalización por CD69 y la producción de TGF- β vía activación de ERK, y sugiere que CD69 desempeña un papel fundamental en la homeostasis linfocitaria.

Ejemplo 14

El empleo de anticuerpos contra CD69 aumenta la respuesta antitumoral in vivo

Se seleccionaron diferentes anticuerpos murinos contra CD69 para examinar el papel de esta molécula en terapia tumoral de ratones en los que se han inducido tumores con células RMA-S. La inoculación intraperitoneal de 10^5 células RMA-S singénicas MHC-I⁺ en ratones C57BL/6 causó un 100% de mortalidad de vida al desarrollo de tumores letales (Fig. 16A). Cuando se trataron varias veces a estos animales con el anticuerpo anti-CD69 2.2, antes y después de la inoculación de las células tumorales, un 80% de los ratones sobrevivieron sin evidencias de desarrollo tumoral (Fig. 16A), tendencia que también se observó cuando se trató a estos animales con una sola dosis del anticuerpo (Fig. 16, y datos no mostrados). De igual manera, el tratamiento de ratones SCID con el mismo anticuerpo también inhibió el crecimiento de tumores inducidos por RMA-S, lo que indica que algunos de los efectos antitumorales persisten en ausencia de linfocitos T o B.

Por otra parte, los ratones tratados con anti-CD69 fueron capaces de eliminar a las células de la línea RM-1, observándose un número muy pequeño de metástasis pulmonares en dichos ratones (1.25 ± 0.9), mientras que los ratones tratados con un control de isotipo eran incapaces de limitar el desarrollo de metástasis pulmonar inducido por estas células, observándose una media de 21.5 ± 5.5 metástasis tras 14 días desde la inyección intravenosa de 10^4 células RM-1.

Ejemplo 15

Los anticuerpos anti-CD69 afectan a los estadios tempranos de crecimiento tumoral en el peritoneo

El efecto *in vivo* del tratamiento con anticuerpos anti-CD69 en el crecimiento tumoral se examinó *ex vivo* en células peritoneales extraídas 3 días después de la inoculación intraperitoneal de 2×10^6 células RMA-S. El análisis de las células peritoneales de ratones tratados con el anticuerpo 2.2 o un control de isotipo demostró que el tratamiento con el anticuerpo inhibía la proliferación de las células tumorales en el peritoneo (3×10^6 en ratones tratados con el anticuerpo vs. 20×10^6 células en el control de isotipo). Se observaron diferencias similares cuando se analizaron las células peritoneales de ratones RAG1^{-/-} tratados con el anticuerpo anti-CD69; se detectó un crecimiento exacerbado de las células RMA-S en los ratones control, pero no se hallaron estas células en un 75% de los ratones tratados con anti-CD69 (Fig. 17). Por tanto, la eliminación de los tumores inducida por CD69 ocurre durante la respuesta inmunitaria temprana, y es eficaz en ausencia de linfocitos T y B.

Ejemplo 16

Respuesta de anticuerpos a DNP-KLH en ratones WT y deficientes para CD69

El posible papel de CD69 en la respuesta B adaptativa se ha analizado. Se usaron distintos protocolos de inmunización para evaluar la respuesta. Para el estudio de la respuesta humoral frente a antígenos T-dependientes se trataron los ratones wt o deficientes para CD69 con $100 \mu\text{g}$ de DNP-KLH a día 0 y 21, usando como adyuvantes CFA o Alum, y con dos rutas de inmunización: i.p. o intradérmica (i.d.) en la base de la cola. Este protocolo es una revisión del protocolo usado en Lauzurica *et al.*, (2000) Blood 95:2312. La dosis de antígeno se incrementó a $100 \mu\text{g}$ por inyección y la segunda inyección se realizó a día 21, para permitir el desarrollo adecuado del centro germinal. Los resultados del experimento se muestran en la Fig. 18. Se midió entonces la presencia de Igs de distintos isotipos específicas para DNP en muestras séricas de día 7 post-inyección (inmunización primaria) o de día 28 post-inyección (siete días tras la segunda inyección, inmunización secundaria).

En la inmunización primaria sólo se obtuvo un aumento significativo en el suero de ratones CD69^{-/-} para la administración s.c. de CFA-DNP-KLH ($p=0.019$, Fig. 18). Por tanto, no había diferencias significativas entre el WT y los ratones deficientes para CD69 para la IgM en inmunización primaria. Los niveles de los subtipos IgG fueron bajos (1:2000 dilución sérica) como corresponde a la respuesta primaria, y no revelaron diferencias (no mostrado).

En la inmunización secundaria, la ruta i.p. fue la más efectiva en la inducción de IgM, sin revelar diferencias significativas (Fig. 18). En cambio, se hallaron diferencias relevantes para IgG2c en respuesta a CFA-DNP-KLH, independientemente de la ruta de administración, aunque la administración i.p. fue la más efectiva (Fig. 18). También la IgG2b y la IgG3 aumentaron en respuesta a CFA-DNP-KLH i.p. Estos resultados sugieren que la ausencia de CD69 favorece de algún modo la colaboración T:B.

En cuanto al adyuvante, se encontraron sólo diferencias significativas cuando se usó el CFA. Estos resultados sugieren que un adyuvante que promueve respuestas Th1, tal como es el CFA, permite la detección de la respuesta

exacerbada tipo Th1 en el ratón deficiente para CD69 más fácilmente que un adyuvante usado para aumentar las respuestas Th2, como la Alum.

También la ruta de administración muestra diferentes resultados, puesto que la administración i.p. de DNP-KLH dió respuestas más efectivas que la inmunización s.c.

Además, la naturaleza del antígeno puede desempeñar un papel en la diferente respuesta inmune, puesto que el DNP-KLH es un antígeno externo, mientras que el colágeno tipo II promueve una reacción como autoantígeno. En conclusión, similitudes significativas se han encontrado usando este sistema y la inmunización secundaria usando colágeno tipo II, como son los incrementos significativos de la IgG2c, IgG2b e IgG3 específica de CII en el ratón deficiente para CD69.

Material y métodos

Animales. Los ratones se cruzaron y 1 mantuvieron de acuerdo con protocolos de seguridad animal en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, Spain). Todos los experimentos se realizaron en la cepa C57BL/6, excepto los experimentos de desarrollo tumoral en RAG2^{-/-}, que se realizaron en animales de la cepa BALB/c. Tanto los ratones control como los CD69^{-/-} tenían de 6 a 12 semanas en el momento de realización de los experimentos. Como control se emplearon ratones compañeros de jaula o animales de exactamente la misma edad cuyos progenitores eran compañeros de jaula. Los ratones RAG1^{-/-} y RAG2^{-/-} se compraron a Jackson Labs (Bar Harbor, Maine, USA). Para la generación de los ratones doblemente deficientes en RAG2 y CD69, se comprobó el estado del locus RAG a través la ausencia de células T CD3⁺ por citometría de flujo. El genotipaje del locus CD69 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa como se ha descrito previamente (Lauzurica *et al.*, 2000).

Inducción y valoración de AIC. Se preparó el CFA disolviendo 100 µg de *M. tuberculosis* inactivado por calor (cepa H37Ra; Difco, Detroit, Michigan, USA) en 20 ml de IFA (Adyuvante Incompleto de Freund). El CII (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) se disolvió a una concentración de 2 mg/ml en 10 mM de ácido acético y se mezcló en una proporción 1:1 con CFA. La emulsión resultante se inyectó en la base de la cola de los animales y se repitió el tratamiento a día 21 como se ha descrito previamente (Campbell *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001). Se empleó el mismo protocolo con la cepa de ratones DBA1 (Harlan, Madison, Wisconsin, USA), empleando CFA en el que se había disuelto 1 mg/ml de *M. tuberculosis* inactivado por calor. Los animales control se trataron con CFA sin CII. Se monitorizó la gravedad de la artritis por examen directo de las patas con un calibre digital de acuerdo con la siguiente escala: grado 0, sin inflamación detestable; 1, ligero enrojecimiento y eritema; 2, inflamación pronunciada; 3, rigidez articular. Se midió cada pata por separado, obteniéndose una puntuación máxima de 12 por cada animal.

Tras el sacrificio, se seleccionaron aleatoriamente las patas, se fijaron, descalcificaron y embebieron en parafina. Posteriormente, se tiñeron las secciones (5 mm de espesor) con hematoxilina y eosina, y se cuantificaron de acuerdo con el siguiente baremo: 0, ausencia de inflamación; 1, ligero engrosamiento de la zona de células sinoviales y/o presencia de algunas células inflamatorias en la periferia; 2, engrosamiento de los límites de la zona sinovial, infiltración de la zona subperiférica y erosiones localizadas en el cartílago; 3, infiltrado en el espacio sinovial, pannus, destrucción del cartílago y erosión ósea.

Bloqueo del TGF-β. El anticuerpo bloqueante contra TGF-β 1D11.16.8 (hibridoma de ratón, isotipo IgG1, adquirido en la ATCC, Manassas, Virginia, USA), y descrito previamente (Dasch *et al.*, 1989) se preparó a 0.2 mg/ml. El tratamiento de los animales se realizó mediante la inyección subcutánea de 25 µl de PBS conteniendo el anticuerpo, un control de isotipo o nada, aplicándose cada 2 días desde la segunda inyección de CII (día 21), monitorizándose la inflamación diariamente. Por otra parte, el efecto del bloqueo de TGF-β en la inducción de tumores se realizó por administración de 0.5 mg del mismo anticuerpo contra TGF-β, inoculado los días -3, -1, y +1 y una vez por semana a partir de esto, tomando como referencia (día 0) el día de inoculación de las células tumorales.

Ensayos de proliferación. Se cultivaron las células extraídas de los nódulos linfáticos y el bazo (2 x 10⁵) en 200 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 50 µM 2-mercaptoetanol y 10% de suero bovino de ternera, y en presencia de una concentración de 0 a 50 µg/ml de CII desnaturalizado (100°C, 10 min) durante 60 h. Se añadió después 1 µCi/pocillo de ³H-TdR (Amersham, Little Chalfont, England) y se mantuvo otras 12 h, antes de su recolección en filtros de fibra de vidrio para la determinación de la incorporación metabólica de ³H-TdR.

Detección de anticuerpos contra CII. Se realizaron experimentos de ELISA para la detección de anticuerpos contra CII como se ha descrito previamente (Campbell *et al.*, 1998). Se emplearon secundarios conjugados con HRP específicos de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgM (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama, USA) e IgA (Sigma).

Aislamiento de células sinoviales. La selección positiva de esplenocitos se realizó usando anticuerpos específicos frente a CD11b, CD3, CD4 y CD8 conjugados con biotina, todos de BD-Pharmingen, y Dynabeads de unión a biotina (Dynal A.S., Oslo, Noruega), dando lugar a un 98% de pureza. Las células sinoviales de ratón se aislaron de ratones AIC WT, como se ha descrito para el tejido sinovial humano (Butler *et al.*, 1997), y más purificación se realizó como se muestra arriba. Tras la selección positiva de las células sinoviales CD11b⁺ y CD3⁺, las células sinoviales se incubaron con anti-CD45 biotinilado y se seleccionaron negativamente usando un exceso de microesferas magnéticas con avidina. Las restantes células CD45 negativas se usaron para la extracción de RNA. Los leucocitos de fluido sinovial

se obtuvieron de las efusiones sinoviales de las rodillas inflamadas de pacientes con artritis reactiva, espondilitis anquilosante y RA, que reunían los criterios del Colegio Americano de Reumatología (1987) (27), y se purificaron con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) por centrifugación en gradiente de densidad.

- 5 *Ensayos de protección de RNasa (RPA) y análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real.* Se homogeneizaron las articulaciones en un Polytron® (Kinematica, Littau, Suiza) y se purificó el RNA total empleando Ultraspec RNA (Biotecx, Houston, Texas, USA). En los ensayos de tumores, se extrajo el RNA de células sinoviales sin fraccionar. Se realizaron los ensayos de protección de actividad RNasa en 2.5-5 µg de RNA empleando el sistema de RPA Riboquant Multiprobe (Pharmingen, San Diego, California, USA). Para la RT-PCR, se transcribieron 2 µg de RNA tratado con Dnasal con la enzima RT MuLV (Roche Diagnostics Ltd., Lewes, Reino Unido). La PCR en tiempo real se realizó en un sistema termociclador rápido Lightcycler (Roche) empleando cebadores pertenecientes a diferentes exones que generaron productos de alrededor de 200 pb.

- 15 *Anticuerpos anti CD69.* Se generaron anticuerpos específicos mediante la fusión de células de mieloma de la línea NS-1 con esplenocitos de ratones CD69^{-/-} (Lauzurica *et al.*, 2000), previamente inmunizados con células pre-B de ratón que expresaban CD69. Se purificaron dichos anticuerpos y se emplearon en experimentos de producción de citocinas *in vitro*.

- 20 *Tratamiento *in vivo* con anti-CD69.* Para la evaluación del efecto del tratamiento con anti-CD69 en la AIC, se inocularon ratones con 300 µg de los anticuerpos anti-CD69 de ratón 2.2 (IgG1) o 2.3 (IgG2a), como tratamiento preventivo (días 20 y 28) o terapéutico (días 32 y 40) y se monitorizó la inflamación de las extremidades. Como control de isotipo se emplearon los anticuerpos 2.8 (IgG1) y 2.22 (IgG2a). Para el tratamiento de tumores, se inyectaron intraperitonealmente 500 µg de anticuerpo 2.2 (días +4, +8, +12) o 100 µg de 2.3 (-1, +2, +4, +8). En los ratones SCID se inyectaron 500 µg del anticuerpo 2.2 (días -1 y +6), y en los RAG1^{-/-} se inyectaron 500 µg de 2.2 el mismo día de la inoculación de las células tumorales. La inoculación de los anticuerpos fue por vía intraperitoneal en todos los casos.

- 30 *Determinación de la producción de citocinas en AIC.* Para determinar los niveles de citocinas en los lavados de tejido articular, se sacrificaron ratones (día 50), se extrajeron las patelas con el sinovio adyacente de las articulaciones de las rodillas de acuerdo con protocolos estándar (Lubberts *et al.*, 2000), y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en 200 µl de medio de cultivo RPMI1640 con 0.1% BSA. Posteriormente se determinaron en los sobrenadantes de cultivo los niveles de TGF-β1 activo y total (Emax ImmunoAssay System; Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA), IL-1β, TNF-α y RANTES (OptEIA ELISA Sets; BD-Pharmingen). Para la producción *in vitro* de citocinas, se incubaron esplenocitos de ratón (pre-estimulados con 5 µg/ml de Con-A (Sigma) durante 16 h y purificados como se ha descrito previamente) con 10 µg/ml de anti-CD69 (clon 2.2) o con un control de isotipo (IgG1) y 20 µg/ml de suero de cabra contra IgG de ratón, específico contra el fragmento Fc (F(ab')₂, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Tras 24 h de cultivo, se determinaron los niveles de TGF-β1 activo y total, IL-1β, TNF-α y RANTES. Finalmente, se determinaron los niveles de TGF-β1 en leucocitos (1 × 10⁶) obtenidos de las articulaciones de pacientes de enfermedades inflamatorias de las articulaciones (RA, artritis reactiva o espondilitis anquilosante) y tratados durante 24 h con el anticuerpo contra CD69 humano TP1/8 o con un control de isotipo, en presencia o ausencia de entrecruzador.

- 45 *Medida de la producción de TGF-β y MCP-1 por ELISA durante la respuesta antitumoral.* Se realizaron dichas medidas en linfocitos T CD3⁺ purificados a partir de suspensiones de nódulos linfoides y bazo de ratones de las cepas C57BL/6 o BALB/c. Los linfocitos T CD3⁺ se aislaron mediante selección por incubación con un anticuerpo contra MAC-1 seguida por dos pasos de adhesión a 4°C a placas de petri tapizadas con un anticuerpo de conejo contra IgG de ratón (DAKO, Glostrup, Dinamarca). La pureza media de este protocolo se situó en >95%, determinada por citometría de flujo. Posteriormente, se resuspendieron los linfocitos en 200 µl/punto de medio Stem Span (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) sin suero, y se estimularon con anti-CD3 (1 µg/ml) inmovilizado en placas de plástico de 96 pocillos. Se añadió el anticuerpo anti-CD69 (clon 2.2, IgG1, K, 20 µg/ml) o un control de isotipo. Para entrecruzar, se emplearon 20 µg/ml del fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo generado en cabra contra IgG de ratón específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch). El inhibidor de MEK1 PD98059 (Calbiochem, LaJolla, California, USA) se empleó a una concentración 20 µM y se añadió 1 h antes que el anticuerpo. Tras 72 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se tomaron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de TGF-β como se ha descrito previamente. Para la medida de MCP-1, se inyectó 1 ml de tioglicolato (3% p/v, Sigma) intraperitonealmente en ratones control y CD69^{-/-}. Los ratones fueron sacrificados a las 72 h y se recuperó el infiltrado leucocitario del peritoneo mediante lavado peritoneal con 5 ml de medio RPMI1640 + 2% suero de ternera a 4°C. Posteriormente, se sembraron las células (2 × 10⁶) en 1 ml de medio completo en placas de 24 pocillos y se estimularon con LPS (1 µg/ml). Se tomaron los sobrenadantes y se midió la producción de MCP-1 como se ha descrito previamente.

- 60 *Cultivos celulares.* Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron: RM1, carcinoma de próstata (H-2^b), cedida por el Dr. T. Thompson, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA), YAC-1 (H-2^a) y RMA (H-2^b), linfomas, RMA-S, linfoma mutado derivado de la línea murina inducida por el virus de Rauscher, y que es deficiente para la carga peptídica del MHC de clase I, y 300.19, línea pre-B murina. Todas ellas se mantuvieron a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂ en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero de ternera inactivado por calor, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin (Gibco-Life Sciences, Gaithersburg, Maryland, USA).

Control tumoral in vivo. Las células tumorales (RMA, RMA-S o RM-1 en 200 μ l de PBS) se inyectaron subcutánea o intraperitonealmente en ratones control o CD69^{-/-} sin tratamiento previo o deplecionados de anticuerpos, como se ha indicado previamente. En experimentos de eliminación de la población NK, se inyectaron intraperitonealmente 100 μ l de anti-Asialo-GM1 (suero de conejo, Wako Chemicals, Richmond, Virginia, USA) 1 día antes de la inoculación de los tumores y en días +2 y +4. En experimentos de eliminación de los linfocitos CD4⁺, se inocularon 100 μ l de anticuerpo GK1.5 (anti-CD4) o un control de isotipo a días -1, +2 y +4 respecto a la inducción de tumores. Se monitorizó la evolución de los tumores mediante pesaje diario de los animales (desarrollo de líquido ascítico). Por motivos éticos, se sacrificaron los animales cuando el peso corporal se había incrementado en un 25%, lo que correspondía inequívocamente a un crecimiento tumoral irreversible.

Metástasis pulmonar de las células RM-1. Se inyectaron 10⁴ células RM1 (en 100 μ l de PBS) en la vena de la cola de ratones control y CD69^{-/-}. Transcurridos 14 días, los animales se sacrificaron, se extrajeron los pulmones, se fijaron en 4% de paraformaldehído en PBS y se cuantificaron las metástasis pulmonares mediante un microscopio de disección.

Citometría de flujo. Se preincubaron las células (10⁶) procedentes de exudado peritoneal o del bazo con una solución bloqueante (PBS conteniendo suero de ternera y de conejo inactivados por calor al 5% y 15% respectivamente, 0.02% azida sódica y anticuerpo 2.4G2), que evita la unión de los anticuerpos a los receptores Fc γ . Posteriormente, las células se incubaron durante 30 min a 4°C con anticuerpos conjugados con FITC o PE, o bien anticuerpos biotinilados seguidos de estreptavidina-FITC o -PE (Southern Biotech). Se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-DX5 (DX5), -2B4 (2B4), -CD3 (145-2C11), -B220/CD45 (RA3-6B2), -CD4 (GK1.5), -CD8 (53.6.7), -CD5 (53-7.3), -CD11b (M1/70) y -CD69 (H1.2F3), todos ellos de Pharmingen. Finalmente, se lavaron las células con PBS frío y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA), analizando 104 células mediante software CellQuest[®] (Becton Dickinson). El número de células recogidas en el peritoneo se determinó mediante un sistema Coulter Multisizer II (Beckton Coulter, Fullerton, California, USA).

Obtención de células NK. Se realizó mediante empleo del sistema CELLection Biotin Binder kit (Dyna, Oslo, Noruega) junto con el anticuerpo biotinilado anti-DX5 de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las células (1 h a 37°C) sobre placas de cultivo de poliestireno (Becton Dickinson). Las células no adheridas se incubaron durante 15 min a 4°C con un anticuerpo biotinilado (DX5), se lavaron 2 veces y se capturaron las células recubiertas de anticuerpo con microesferas CELLection (1 \times 10⁷ microesferas por cada 1 \times 10⁶ células). La pureza obtenida fue siempre >95%. Las células NK se mantuvieron en medio completo (20% FCS) suplementado con 1000 UI/ml de rIL-2 humana (72 h).

Ensayo de liberación de ⁵¹Cr. La actividad citotóxica directa de las células NK se determinó mediante experimentos estándar de liberación de ⁵¹Cr. En todos los experimentos se mezclaron 5 \times 10³ células diana YAC-1 marcadas con Na₂⁵¹CrO₄ con células efectoras a las proporciones indicadas (4 h, 37°C). La liberación espontánea de ⁵¹Cr se determinó incubando las células diana con medio sin células; la máxima liberación se determinó incubando las células con 2.5% Tritón X-100. El porcentaje de lisis específica se calculó como:

$$\% \text{ lisis específica} = [(\text{cpm muestra} - \text{cpm espontánea}) / (\text{cpm máxima} - \text{cpm espontánea})] \times 100.$$

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y la liberación espontánea de Cr fue siempre < 10%.

Ensayos de muerte celular. Los esplenocitos (4 \times 10⁶/ml) de ratones inoculados con células RM-1 (3 días con 10⁵ células) se cultivaron en placas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA), y se determinó la viabilidad celular 24 h después de iniciarse el cultivo. Se monitorizó el ciclo celular, se tiñeron las células con yoduro de propidio (IP), y se determinó la apoptosis por citometría de flujo en un citómetro Coulter XL (Beckman Coulter). Los datos se expresan como la media aritmética \pm d.e. (n=9). La actividad caspasa-3 se determinó a las 48 h de inicio del cultivo por incubación con el sustrato PhiPhiLux-GID2 (OncoImmunin, College Park, Maryland, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis por citometría de flujo se realizó inmediatamente después de los 60 min de incubación. Las células peritoneales (1 \times 10⁶) de ratones control fueron cultivadas en placas de 24 pocillos y se determinó su viabilidad por tinción con IP. Las células IP⁺ se consideraron apoptóticas.

Western blot. Se aislaron linfocitos T de ratones C57BL/6 con anti-CD3 (5 μ g/ml) inmovilizado en plástico (37°C, 12 h). Las células se recogieron, se lavaron 2 veces y se cultivaron 4 h en medio sin suero. Posteriormente se añadió un anticuerpo contra CD69 (IgG1) o un control de isotipo a 10 μ g/ml, y se incubaron 30 min a 4°C en hielo. A continuación se lavaron las células 2 veces y se añadió un anticuerpo entrecruzador (generado en cabra contra IgG de ratón, específico del fragmento Fc, F(ab')₂, 20 μ g/ml). La reacción se detuvo a los tiempos indicados añadiendo PBS frío, tras lo cual las células se centrifugaron y lisaron en tampón de lisis frío (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS p/v, 10% glicerol, 50 mM DTT, 0.01% azul de bromofenol p/v) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Tras centrifugar los lisados (13000 \times g, 20 min, 4°C), los sobrenadantes se separaron en geles de poliacrilamida del 12%, se transfirieron a membrana PVDF (BioRad, Hercules, California, USA), y se realizaron experimentos de Western blot con los anticuerpos indicados. El anticuerpo policlonal anti-fosfo-ERK 1/2 era de Calbiochem. Se eliminó la señal del blot y se reincubó con un anticuerpo monoclonal contra ERK 1/2 (Zymed Lab. Inc., San Francisco, California, USA). Se emplearon secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) y se revelaron las bandas por ECL.

Análisis de viabilidad celular. Se incubaron los linfocitos T en las mismas condiciones que para producción de TGF- β . La viabilidad celular se determinó a las 24 y 48 h de cultivo mediante tinción con azul tripán.

Bibliografía

- 5 **Allavena, P., G. Bianchi, D. Zhou, J. van Damme, P. Jilek, S. Sozzani, and A. Mantovani.** 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24:3233-6.
- 10 **Allen, J.B., et al.** 1990. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor-beta. *J. Exp. Med.* 171:231-247.
- Arnett, F.C., et al.** 1988. The American Rheumatoid Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
- 15 **Border, W.A., and E. Ruoslahti.** 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J. Clin. Invest.* 90:1-7.
- Brandes, M.E., et al.** 1991. Transforming growth factor β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J. Clin. Invest.* 87:1108-1113.
- 20 **Butler, D.M., A.M. Malfait, L.J. Mason, P.J. Warden, G. Kollias, R.N. Maini, M. Feldmann, and F.M. Brennan.** 1997. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J. Immunol.* 159:2867-76.
- 25 **Campbell, I.K., J.A. Hamilton, and I.P. Wicks.** 2000. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2^b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 30:1568-1575.
- Campbell, I.K., K. O'Donnell, K.E. Lawlor, and I.P. Wicks.** 2001. Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF. *J. Clin. Invest.* 107:1519-27.
- 30 **Campbell, I.K., M.J. Rich, R.J. Bischof, A.R. Dunn, D. Grail, and J.A. Hamilton.** 1998. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J. Immunol.* 1998:3639-3644.
- 35 **Carr, M.W., S.J. Roth, E. Luther, S.S. Rose, and T.A. Springer.** 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3652-6.
- Caspar-Bauguil, S., M. Saadawi, A. Negre-Salvayre, M. Thomsen, R. Salvayre, and H. Benoist.** 1998. Mildly oxidized low-density lipoproteins suppress the proliferation of activated CD4⁺ T-lymphocytes and their interleukin 2 receptor expression *in vitro*. *Biochem. J.* 330:659-666.
- 40 **Cazac, B.B., et al.** 2000. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA *in vivo*. *Immunity* 13:443-451.
- 45 **Cebrian, M., E. Yague, M. Rincon, M. Lopez-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid.** 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168:1621-37.
- Chen, W., M.E. Frank, W. Jin, and S.M. Wahl.** 2001. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 14:715-25.
- 50 **Chen, W., et al.** 1998. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) induces transforming growth factor-beta production by murine CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 188:1849
- 55 **Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner.** 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265:1237-1240.
- Corte G, Moretta L, Damiani G, Mingari MC, Bargellesi A.** Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humans. *Eur. J. Immunol.* 1981 Feb;11(2):162-4.
- 60 **Cosulich, M.E.** 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84:4205-4209.
- Coventry, B.J., S.C. Weeks, S.E. Heckford, P.J. Sykes, J. Bradley, and J.M. Skinner.** 1996. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J. Immunol.* 156:3486-3492.
- 65 **Dasch, J.R., D.R. Pace, W. Waegell, D. Inenaga, and L. Ellingsworth.** 1989. Monoclonal antibodies recognizing

transforming growth factor-beta. Bioactivity neutralization and transforming growth factor beta 2 affinity purification. *J. Immunol.* 142:1536-41.

Dighe AS, R.E., Old LJ, Schreiber RD. 1994. Enhanced *in vivo* growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* 1:447-456.

Esplugues, E. et al. 2003. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J. Exp. Med.* 197:1093-1106.

Falcone, M., and N. Sarvetnick. 1999. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 11:670-676.

Fava, R., et al. 1989. Active and latent forms of transforming growth factor-beta activity in synovial effusions. *J. Exp. Med.* 169:291

Feldmann, M. 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2:364-371.

Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Rev. Immunol.* 14:397-440.

Feng, C., et al. 2002. A potencial role for CD69 in thymocyte migration. *Int. Immunol.* 14:535-544.

García-Monzón, C., R. Moreno-Otero, J.M. Pajares, A. García-Sánchez, M. López-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1990. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8+ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology.* 98:1029-1035.

Gerosa F, Tommasi M, Scardoni M, Accolla RS, Pozzan T, Libonati M, Tridente G, Carra G. Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes. *Mol Immunol.* 1991 Jan-Feb;28(1-2):159-68.

Gill PS, H.W.J., Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA, Bernstein-Singer M, Espina BM, Cabral L, Allen S, Kornblau S, Pike MC, Levine AM. 1995. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N. Engl. J. Med.* 332:1744-1748.

Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 12:171-81.

Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-b signaling in T cells. *Nat. Med.* 7:1118-1122.

Griffiths, M.M., et al. 1999. Mapping autoimmunity genes. *Curr. Opin. Immunol.* 11:689-700.

Gu, L., B. Rutledge, J. Fiorillo, C. Ernst, I. Grewal, R. Flavell, R. Gladue, and B. Rollins. 1997. *In vivo* properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Leukoc Biol.* 62:577-80.

Hallegua, D.S., et al. 2002. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 61:960-967.

Hara, T., L.K. Jung, J.M. Bjorndahl, and S.M. Fu. 1986. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o- tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J. Exp. Med.* 164:1988-2005.

Hartnell, A., D.S. Robinson, A.B. Kay, and A.J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated *in vivo* in asthma and *in vitro* by cytokines. *Immunology.* 80:281-286.

Hernandez-Garcia, C., et al. 1996. The CD69 activation pathway in rheumatoid arthritis synovial fluid T cells. *Arthritis Rheum.* 39:1277-1286.

Hojo, M., T. Morimoto, M. Maluccio, T. Asano, K. Morimoto, M. Lagman, T. Shimbo, and M. Suthanthiran. 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* 397:530-534.

Ji, H., et al. 2002. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody induced arthritis. *J. Exp. Med.* 196:77-85.

Kaplan DH, S.V., Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:7556-61.

Kehrl, J.H., L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn, and A.S.

Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 163:1037-50.

Klein et al. 2001 Gene Expression Profiling of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals a Homogeneous Phenotype Related to Memory B Cells. *J. Exp. Med.* 11:1625.

Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 407:789-95.

Kulkarni, A.B., et al. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:770-774.

Kuruvilla, A.P., **R. Shah,** G.M. **Hochwald,** H.D. **Liggitt,** M.A. **Palladino,** and G.J. **Thorbecke.** 1991. Protective effect of transforming growth factor b1 on experimental autoimmune disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2918-2921.

Laffon, A., **R. Garcia-Vicuna,** A. **Humbria,** A.A. **Postigo,** A.L. **Corbi,** M.O. de **Landazuri,** and F. **Sanchez-Madrid.** 1991. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 88:546-52.

Lanier LL, **Buck DW,** **Rhodes L,** **Ding A,** **Evans E,** **Barney C,** **Phillips JH.** Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med.* 1988 May 1;167(5):1572-85.

Lauzurica, P., **D. Sancho,** M. **Torres,** B. **Albella,** M. **Marazuela,** T. **Merino,** J.A. **Bueren,** A.C. **Martinez,** and F. **Sanchez-Madrid.** 2000. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood.* 95:2312-20.

Letterio, J.J., and A.B. **Roberts.** 1997. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol.* 84:244-50.

Letterio, J.J., and A.B. **Roberts.** 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* 16:137-61.

Lopez-Cabrera, M. et al. 1993. Molecular cloning, expression and chromosomal location of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* 178:537-547.

Lubberts, E., L.A. **Joosten,** F.A. **van de Loo,** L.A. **van den Gersselaar,** and W.B. **van den Berg.** 2000. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum.* 43:1300-6.

Maini, R.N., et al. 1999. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 354:1932-1939.

Mampaso, F., F. **Sanchez-Madrid,** R. **Marcen,** A. **Molina,** J. **Pascual,** T. **Bricio,** A. **Martin,** and V. **Alvarez.** 1993. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation.* 56:687-691.

McInnes, I.B., et al. 1997. Interleukin 15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3:189-195.

Mc Indoe, R.A., et al. 1999. Localization of non-MHC collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/lj mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:2210-2214.

Myers, L.K., et al. 1997. Collagen-induced J arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* 61:1861-1878.

Nakayama, T. et al. 2002. The generation of mature, single-positive thymocytes *in vivo* is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 168:87-94.

O'Shea, J.J., A. **Ma,** and P. **Lipsky.** 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:37-45.

Piccirillo, C.A., Y. **Chang,** and G.J. **Prud'homme.** 1998. Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) somatic gene therapy prevents autoimmune disease in NOD mice. *J. Immunol.* 161:3950-3956.

Powrie, F., J. **Carlino,** M.W. **Leach,** S. **Mauze,** and R.L. **Coffman.** 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 183:2669-2674.

- Prud'homme**, G.J., and C.A. **Piccirillo**. 2000. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 14:23-42.
- Remmers**, E.F., *et al.* 1996. A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat. Genet.* 14:82-85.
- Rosenwald** *et al.* 2001. Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 11:1639.
- Sancho**, D., *et al.* 2000. Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. *J. Immunol.* 165:3868-3875.
- Sancho**, D., *et al.* 1999. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 and interleukin 15. *Blood* 93:886-896.
- Sancho**, D., *et al.* 2003. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor beta production in collagen induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 112: 872-882.
- Sanchez-Mateos**, P., M. **Cebrian**, A. **Acevedo**, M. **Lopez-Botet**, M.O. de **Landazuri**, and F. **Sanchez-Madrid**. 1989. Expression of a gp33/27,000 Mw activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology.* 68:72-79.
- Sanchez-Mateos** P, **Sanchez-Madrid** F. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur. J. Immunol.* 1991 21 (10):2317-25.
- Santis**, A.G., *et al.* 1992. Tumor necrosis factor-alpha production induced in T. lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur. J. Immunol.* 22:1253-1259.
- Shankaran** V, I.H., **Bruce** AT, **White** JM, **Swanson** PE, **Old** LJ, **Schreiber** RD. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410:1107-1111.
- Shull**, M.M., *et al.* 1992. Targeted disruption of mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Smyth**, M.J., and D.I. **Godfrey**. 2000. NKT cells and tumor immunity a double-edged sword. *Nat Immunol.* 1:459-60.
- Smyth**, M.J., and R.W. **Johnstone**. 2000. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech.* 50:196-208.
- Smyth**, M.J., J.M. **Kelly**, A.G. **Baxter**, H. **Korner**, and J.D. **Sedgwick**. 1998. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med.* 188:1611-9.
- Smyth**, M.J., K.Y. **Thia**, S.E. **Street**, D. **MacGregor**, D.I. **Godfrey**, and J.A. **Trapani**. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192:755-60
- Testi**, R.D., *et al.* 1989. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J. Immunol.* 143:1123-1128.
- Testi**, R., D. **D'Ambrosio**, R. **De Maria**, and A. **Santoni**. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today.* 15:479-83.
- Van den Broek** ME, K.D., **Ossendorp** F, **Toes** R, **Vamvakas** S, **Lutz** WK, **Melief** CJ, **Zinkernagel** RM, **Hengartner** H. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184:1781-90.
- Walunas**, T.L. *et al.* 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Wahl**, S.M., *et al.* 1990. Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor-beta and IL-1 in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* 145:2514.
- Wandstrat**, A., *et al.* 2001. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat. Immunol.* 2:802-809.
- Watson**, W.C., *et al.* 1985. Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC), and non MHC loci. *J. Exp. Med.* 162:1878-1891.

Weinblatt, M.E., et al. 1999. A trial on etanercept, a recombinant tumour necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 340:253-259.

Williams, R.O., et al. 2000. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with anti-TNF alpha/anti-CD4 therapy. *J. Immunol.* 165:7240-7245.

Yu, X., et al. 2001. Anti-CD69 autoantibodies cross-react with low density lipoprotein receptor related protein 2 in systemic autoimmune diseases. *J. Immunol.* 166:1360.

Zajac, A.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.J. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188:2199-2204.

Ziegler, S.F., et al. 1993. Molecular characterization of early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur. J. Immunol.* 23:1643-1648.

Zingoni, A., G. Palmieri, S. Morrone, M. Carretero, M. Lopez-Botel, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 2000. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2-A inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.* 30:644-51.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de una cantidad efectiva de un modulador de una molécula de activación temprana, la cual es una molécula de anticuerpo antagonista anti-CD69 seleccionado de entre una molécula de anticuerpo humanizada anti-CD69, una molécula de anticuerpo humana anti-CD69, una molécula de anticuerpo quimérica anti-CD69 y una molécula de anticuerpo de inmunización anti-CD69 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que necesite, o pueda beneficiarse de, una respuesta inmune aumentada y dicho antagonista disminuye la señalización por la molécula de activación temprana o reduce la interacción de la molécula de activación temprana con un ligando de dicha molécula de activación temprana.
- 10 2. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque dicho desorden se **caracteriza** por una respuesta inmune disminuida.
- 15 3. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque dicho desorden se **caracteriza** por tejido o células no deseados o **caracterizados** por una proliferación no deseada de células.
- 20 4. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque dicho desorden es cáncer.
- 5 5. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque donde dicho desorden es fibrosis.
- 25 6. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque dicho desorden es una inmunodeficiencia.
- 30 7. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada** porque la inmunodeficiencia se selecciona de entre: desórdenes de inmunodeficiencia heredada, desórdenes de inmunodeficiencia congénita, síndrome de inmunosupresión asociado con radioterapia, y síndrome de inmunosupresión asociado con quimioterapia.
- 35 8. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de una cantidad efectiva de un antígeno y/o un DNA que codifica para antígeno y un antagonista de la molécula de activación temprana el cual es una molécula de anticuerpo antagonista anti-CD69 seleccionada de entre una molécula de anticuerpo humanizada anti-CD69, una molécula de anticuerpo humana anti-CD69, una molécula de anticuerpo quimérica anti-CD69 y una molécula de anticuerpo de inmunización anti-CD69 para la fabricación de un medicamento destinado a potenciar la respuesta inmune contra de dicho antígeno en un sujeto.
- 40 9. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 8 **caracterizada** porque dicho antígeno está incluido en una vacuna.
- 45 10. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de una cantidad efectiva de un eliminador que es una molécula de anticuerpo anti-CD69 eliminadora de células que expresan CD69, seleccionada de entre: una molécula de anticuerpo humanizada anti-CD69, una molécula de anticuerpo humana anti-CD69, una molécula de anticuerpo quimérica anti-CD69 y una molécula de anticuerpo de inmunización anti-CD69 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición **caracterizada** por una respuesta inmune no deseada.
- 50 11. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es un desorden inflamatorio agudo o crónico, o una enfermedad inmune.
- 55 12. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es una enfermedad autoinmune.
- 60 13. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden se selecciona del grupo consistente en: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune, tiroiditis, y otras enfermedades inmunes órgano-específicas, incluyendo la psoriasis.
- 65 14. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es de tipo neurológico, gastrointestinal, cardiovascular o respiratorio.
15. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es un desorden de tipo neurológico seleccionado de entre:

esclerosis múltiple, miastenia grave, y otras enfermedades inmunes neurológicas.

16. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es un desorden gastrointestinal seleccionado del siguiente grupo: enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad celíaca, y hepatitis.

17. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es un desorden de tipo respiratorio, seleccionado de entre: enfisema, infecciones de las vías respiratorias.

18. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque dicho desorden es un desorden de tipo cardiovascular seleccionado del siguiente grupo: aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis, vasculitis, y otras enfermedades cardiológicas de naturaleza inmune.

19. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es un proceso alérgico o una reacción de hipersensibilidad (tipos I, II, III, y IV), incluyendo asma, rinitis, y otras reacciones de hipersensibilidad mediadas por el sistema inmune.

20. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden es el rechazo de un trasplante o injerto.

21. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizada** porque dicho desorden o condición es: daño de pulmón agudo, síndrome de distress respiratorio agudo, bronquitis, fibrosis cística, daño por reperfusión, nefritis, pancreatitis, oclusión arterial, accidente cerebro-vascular, daño inducido por luz ultravioleta, vasculitis, y sarcoidosis.

22. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de una cantidad efectiva de un eliminador de células que expresan la molécula de activación temprana, el cual es una molécula de anticuerpo anti-CD69 eliminadora de células que expresan CD69 seleccionada de entre una molécula de anticuerpo humanizada anti-CD69, una molécula de anticuerpo humana anti-CD69, una molécula de anticuerpo quimérica anti-CD69 y una molécula de anticuerpo de inmunización anti-CD69, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa CD69.

23. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 22 **caracterizado** porque el cáncer que expresa la molécula de activación temprana se selecciona del grupo consistente en: neoplasias hematopoyéticas, incluyendo enfermedades que implican a células de origen hematopoyético hiperplásicas o neoplásicas, tales como: linfomas y leucemias linfáticas.

24. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 22 **caracterizada** porque el cáncer que expresa una molécula de activación temprana es un linfoma y el linfoma se selecciona del grupo consistente en: linfoma de células T (incluyendo linfomas de células T periféricas, linfoma/leucemia de células T en el adulto (ATL, *Adult T cell leukemia/lymphoma*), linfoma cutáneo de células T (CTCL, *Cutaneous T cell lymphoma*), leucemia de linfocitos grandes granulares (LGF, *Large Granular lymphocytic leukemia*), linfoma de células B, linfoma de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin.

25. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 22 **caracterizada** porque el cáncer que expresa una molécula de activación temprana es una leucemia linfática y la leucemia linfática se selecciona del grupo consistente en: leucemias agudas poco diferenciadas, p.e., leucemia aguda megacarioblástica; desórdenes mieloides, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia aguda promieloide (APML, *Acute ProMyeloid Leukemia*), leucemia aguda mieloide (AML, *Acute Myelogenous leukemia*), y leucemia mielogénica crónica (CML, *Chronic Myelogenous Leukemia*); tumores linfoides, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia linfoblástica aguda (ALL, *Acute Lymphoblastic Leukemia*), que incluye las del linaje B y T, leucemia linfática crónica (CLL, *Chronic Lymphocytic Leukemia*), leucemia pro-linfocítica (PLL, *Prolymphocytic Leukemia*), leucemia de células peludas (HLL, *Hairy cell Leukemia*), y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM).

26. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 22 **caracterizada** porque el cáncer que expresa la molécula de activación temprana es un tumor no hematopoyético que puede expresar una molécula de activación temprana de manera ectópica.

27. Mejoras introducidas en la patente de invención P200300252 correspondiente a la utilización de acuerdo con la reivindicación 25 **caracterizado** porque la leucemia linfática es una leucemia linfática crónica B sin mutaciones en las inmunoglobulinas.

Fig. 1-A

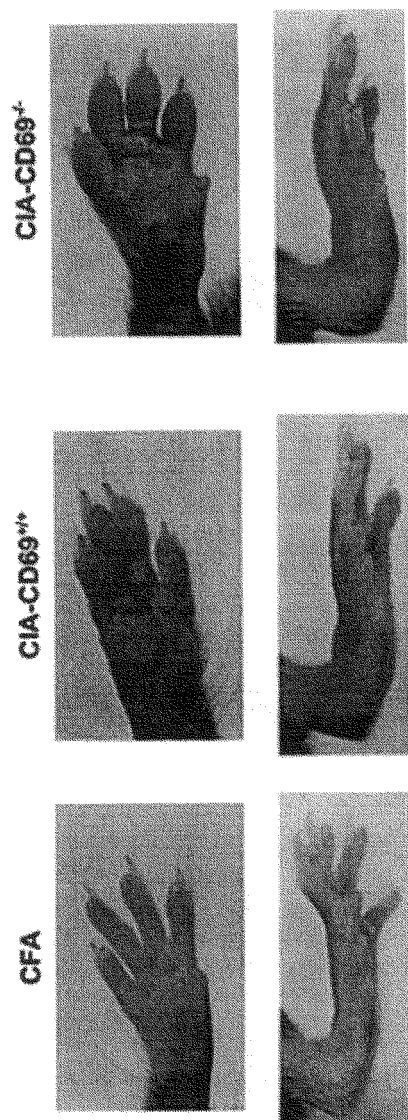


Fig. 1-B

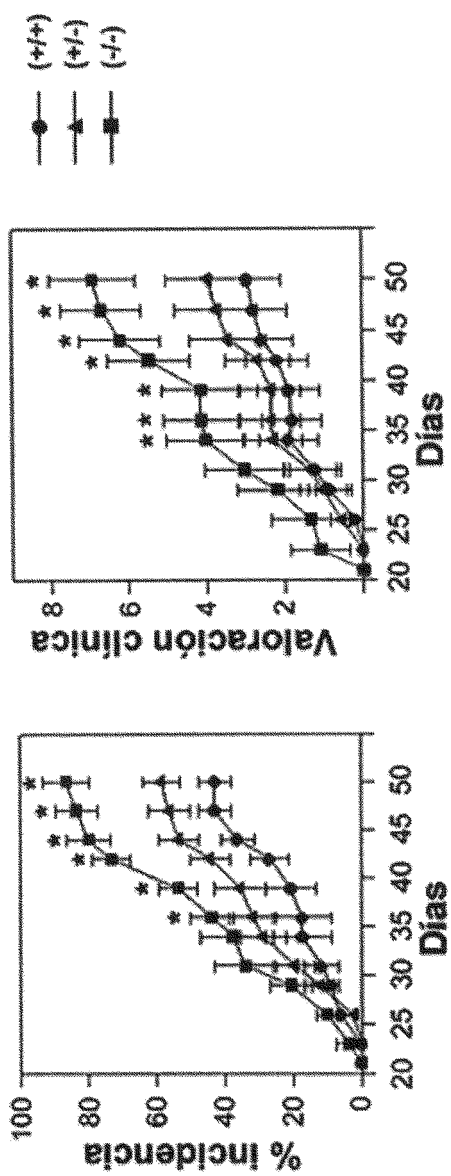


Fig. 2-A

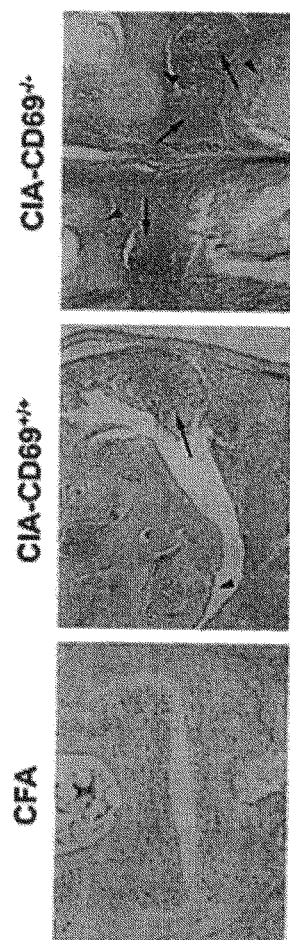


Fig. 2-B

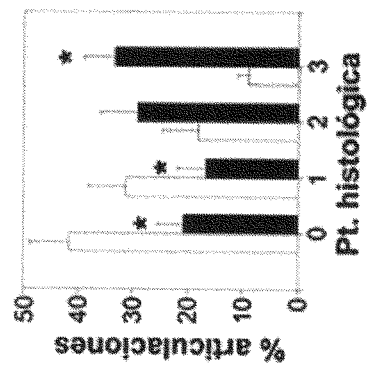


Fig. 3-A



Fig. 3-B

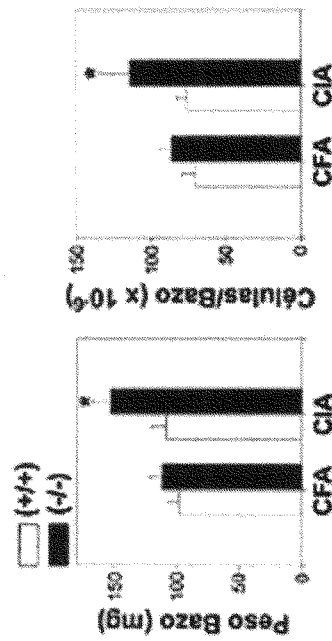


Fig. 3-C

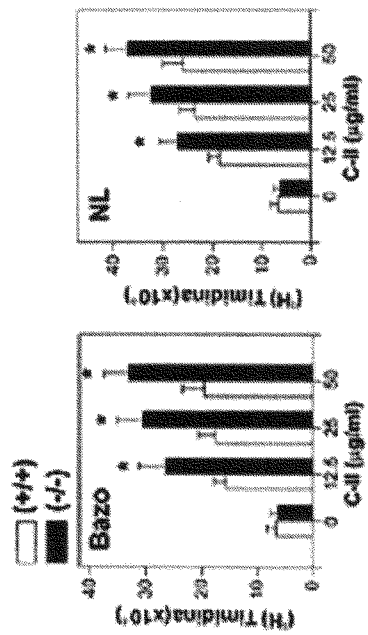


Fig. 3-D

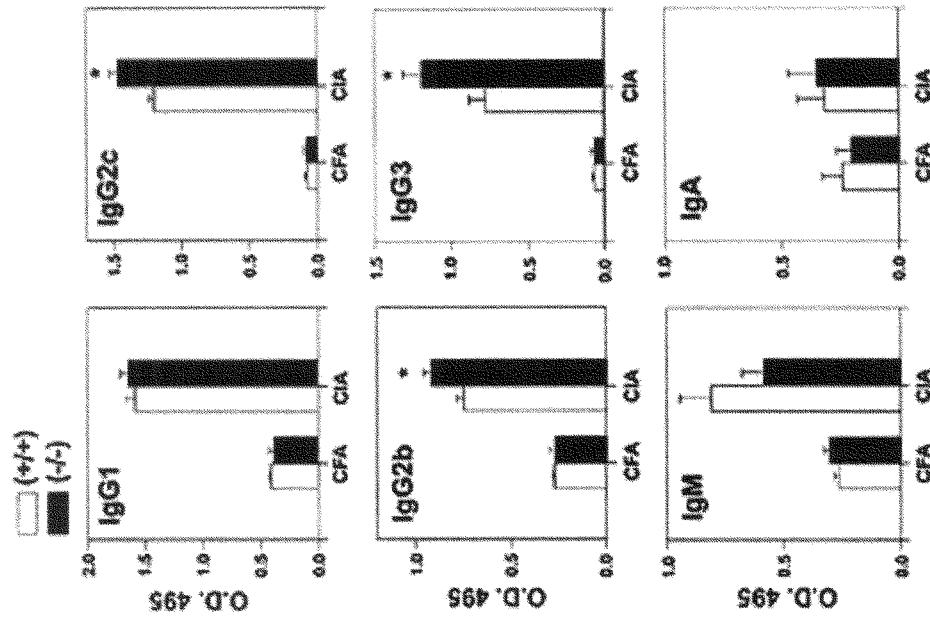


Fig. 4

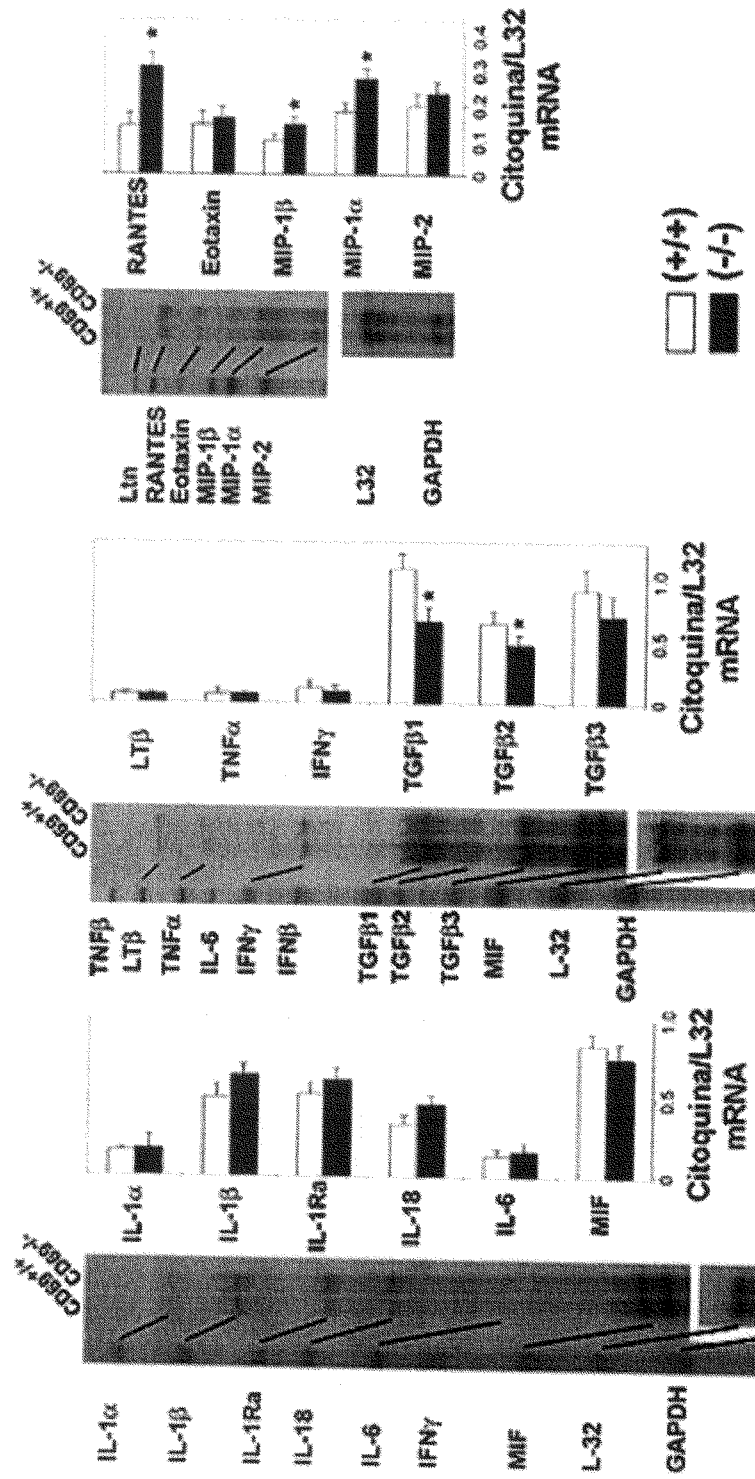


Fig. 5-A

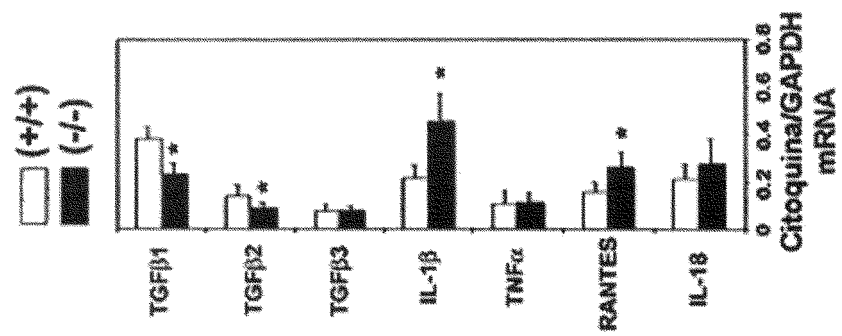


Fig. 5-B

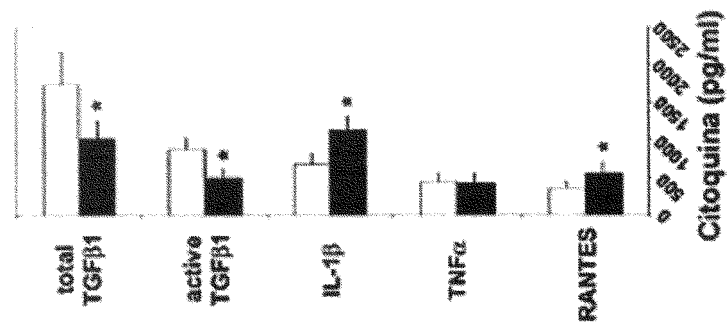
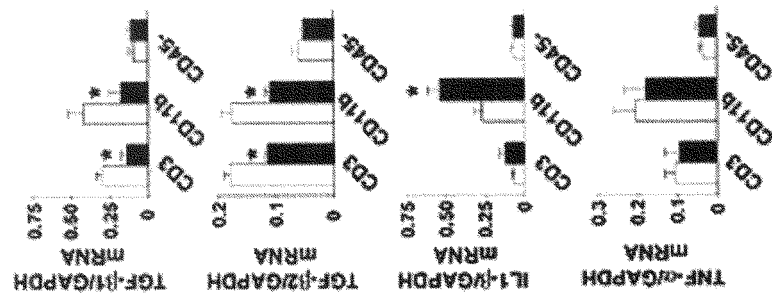


Fig. 5-C



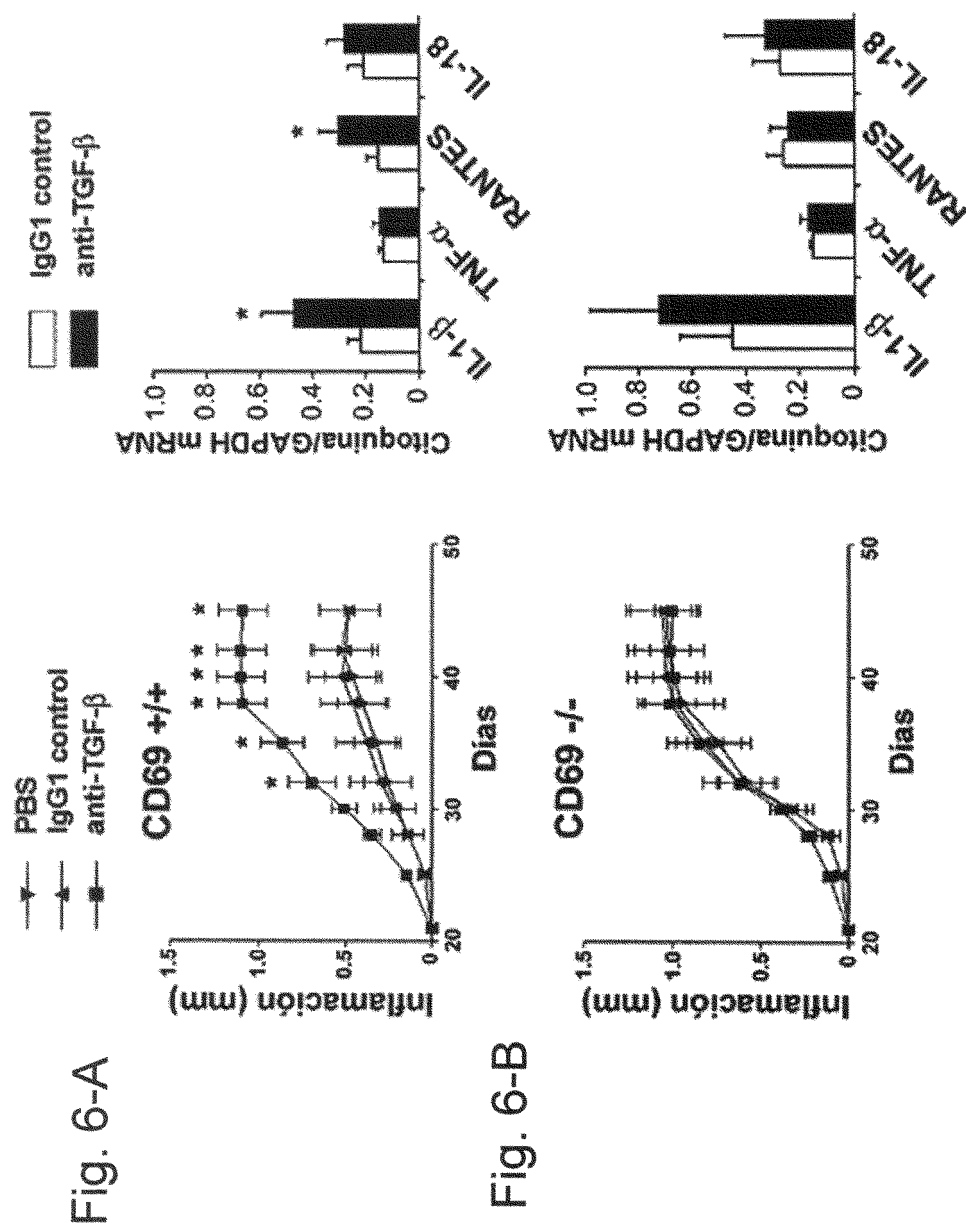


Fig. 7-A

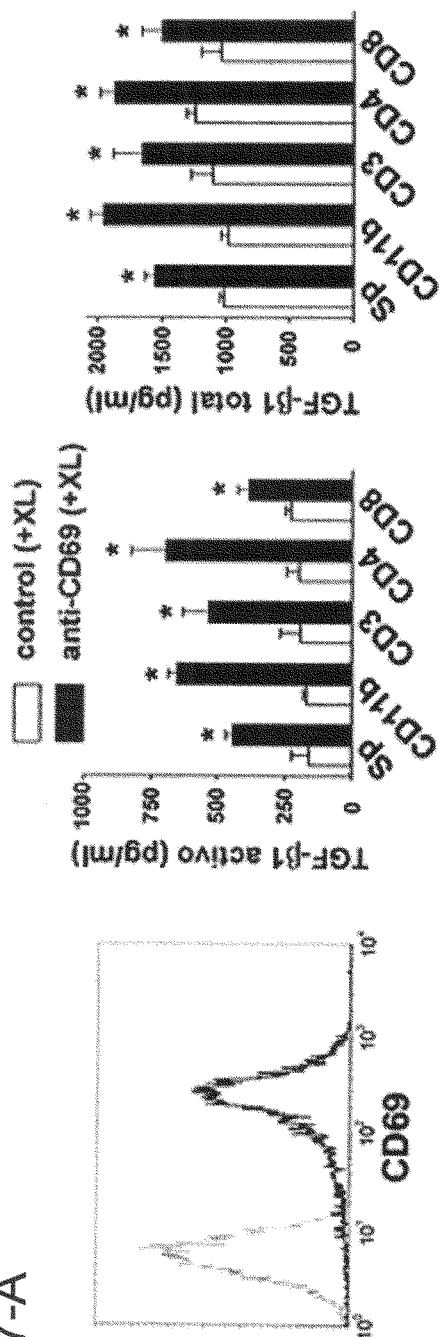


Fig. 7-B

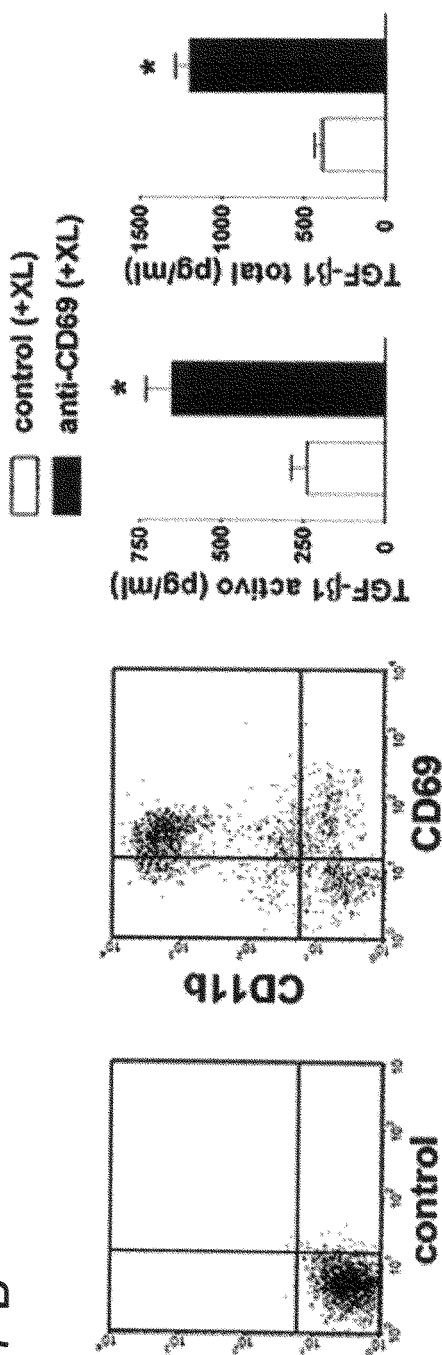


Fig. 8-A

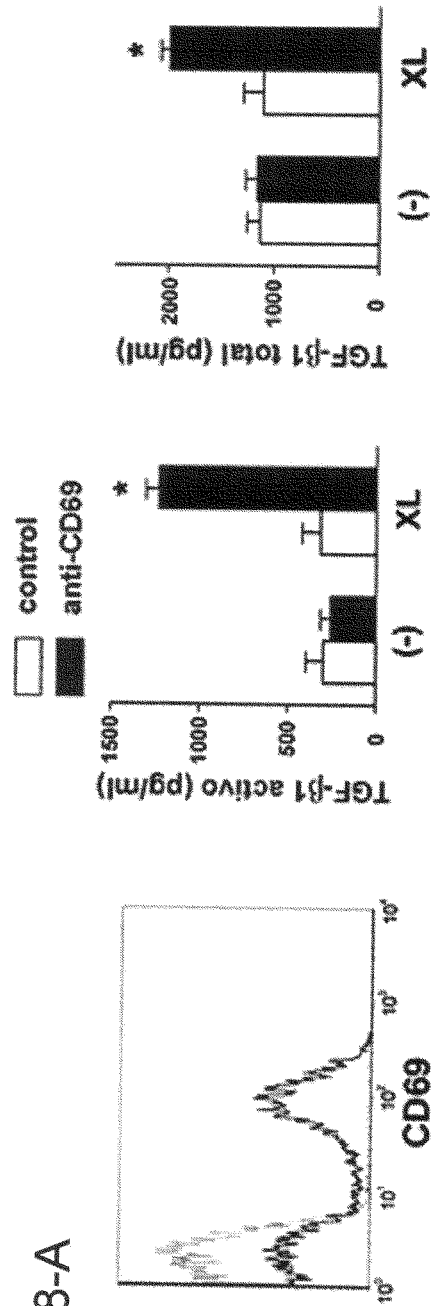


Fig. 8-B

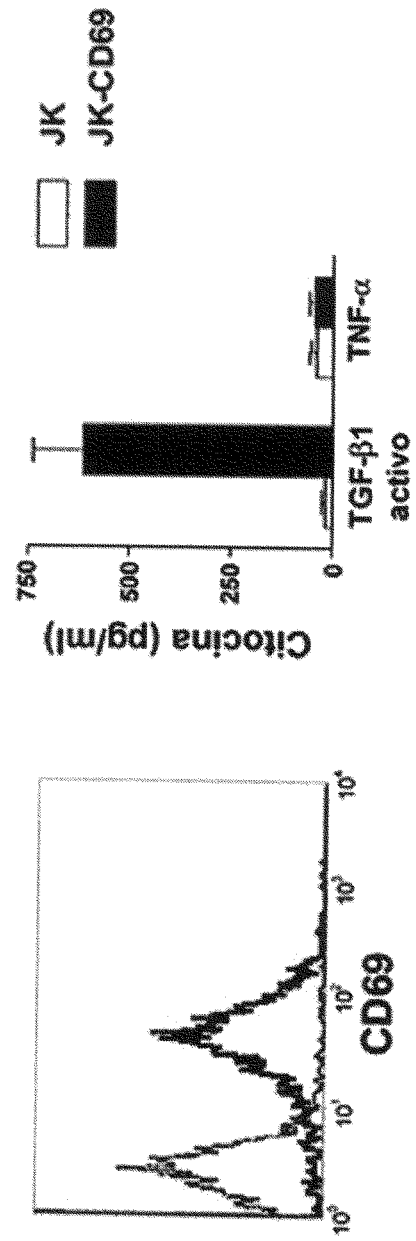


Fig. 9-A

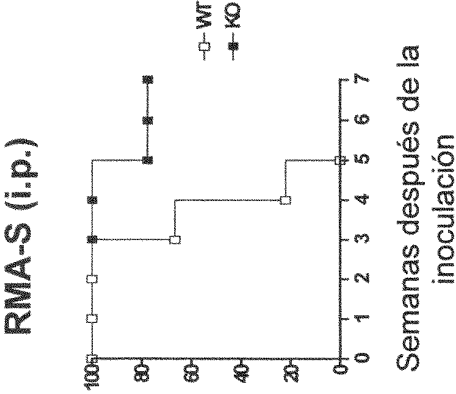


Fig. 9-B

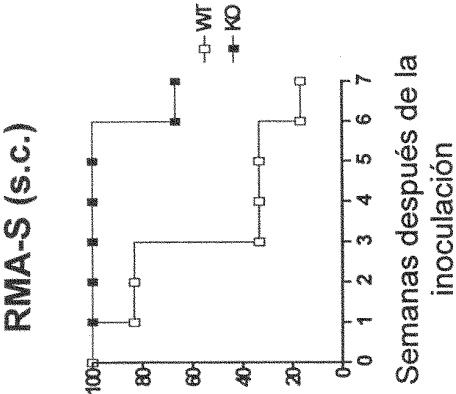


Fig. 9-C

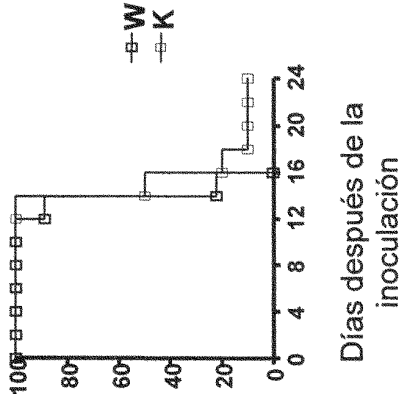


Fig. 9-D

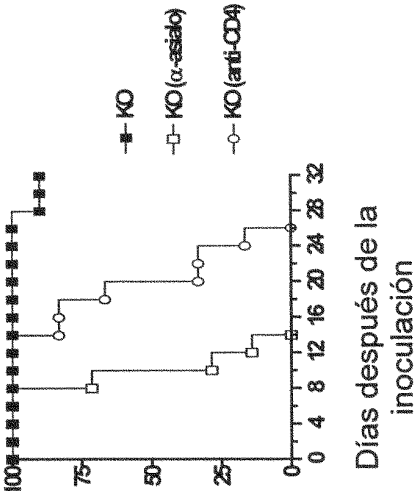
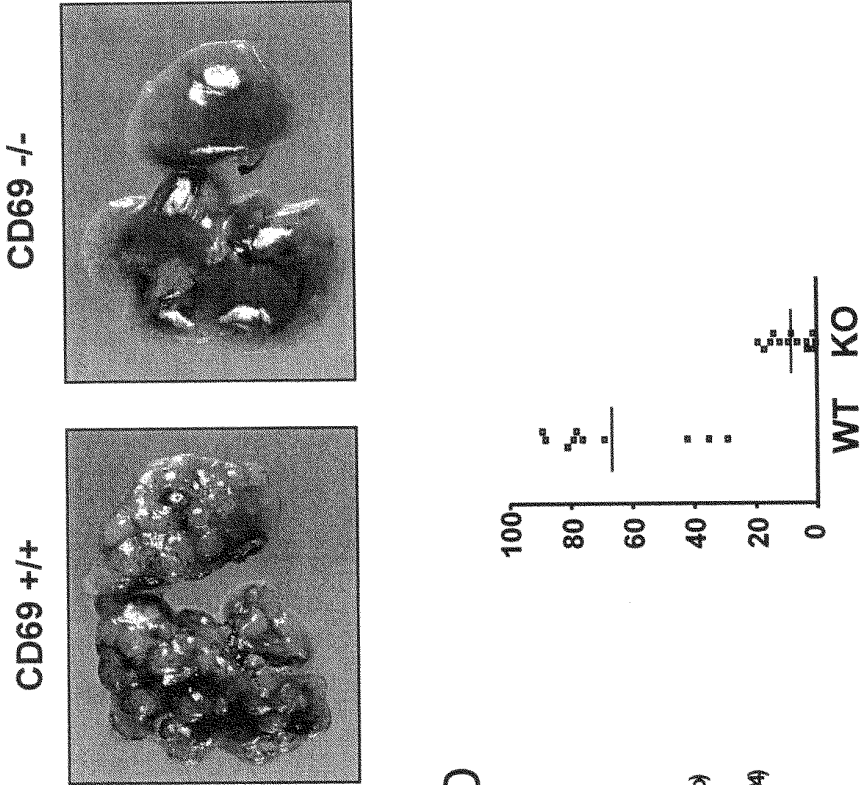


Fig. 9-E



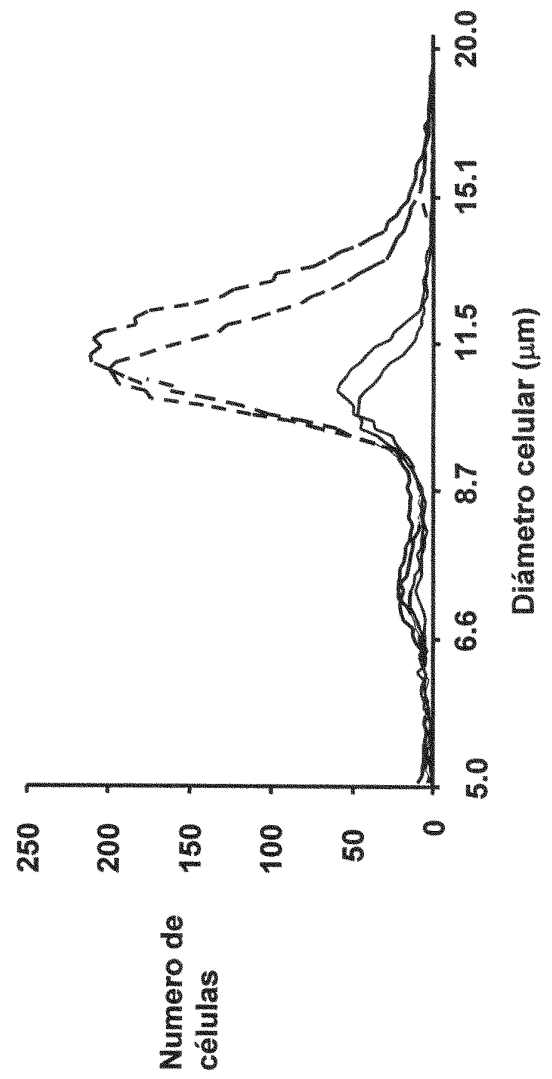
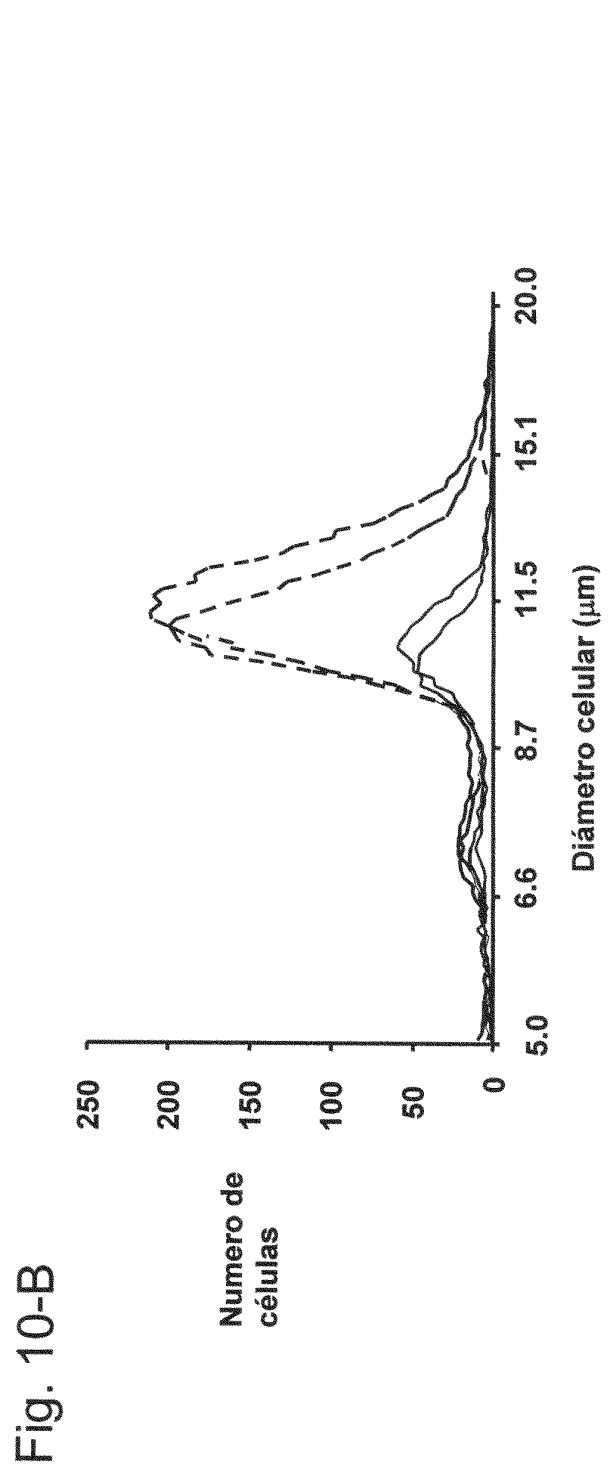
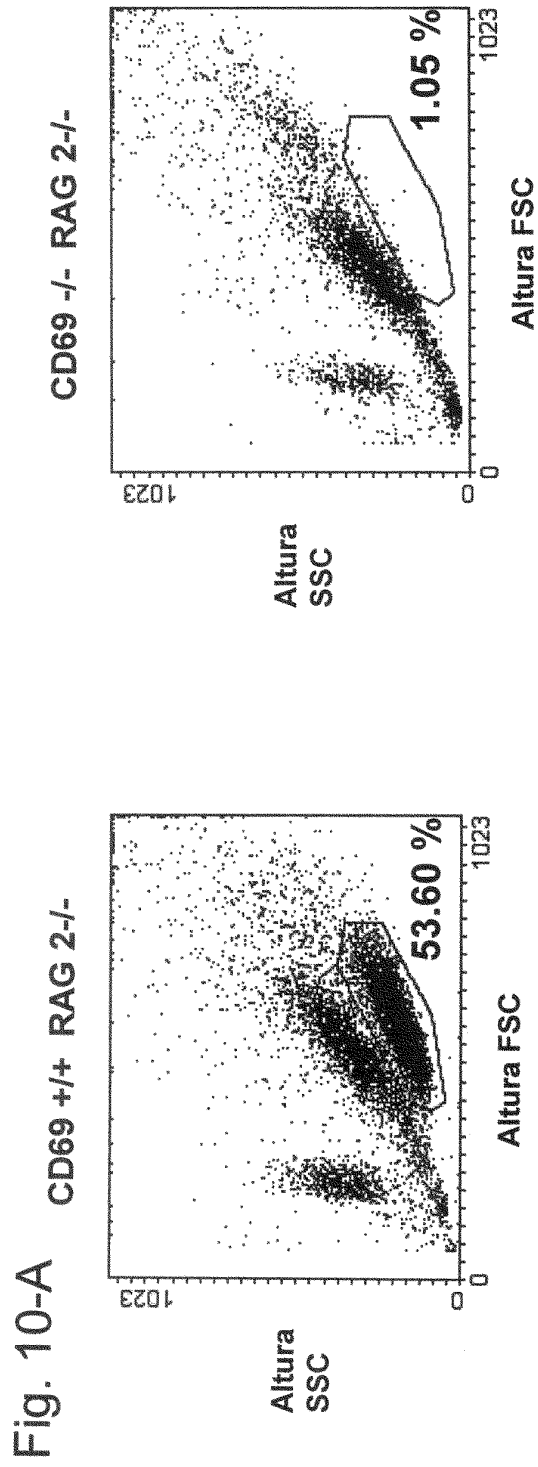


Fig. 11-A

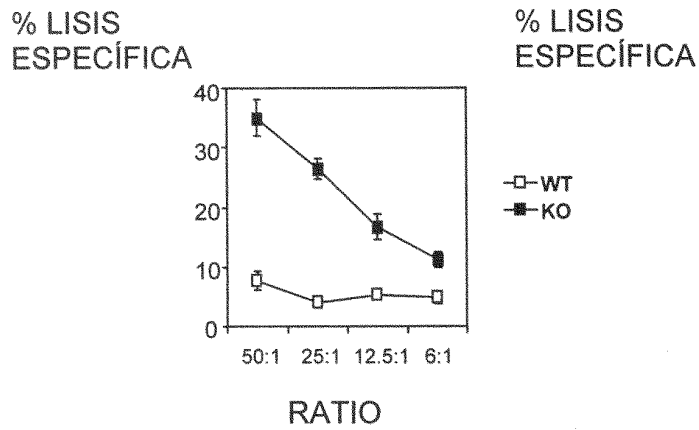


Fig. 11-B

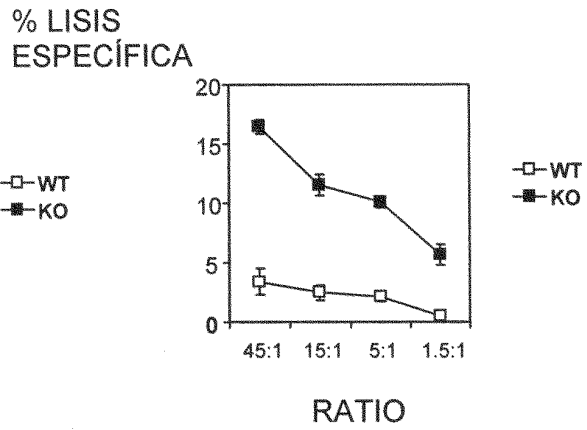


Fig. 11-C

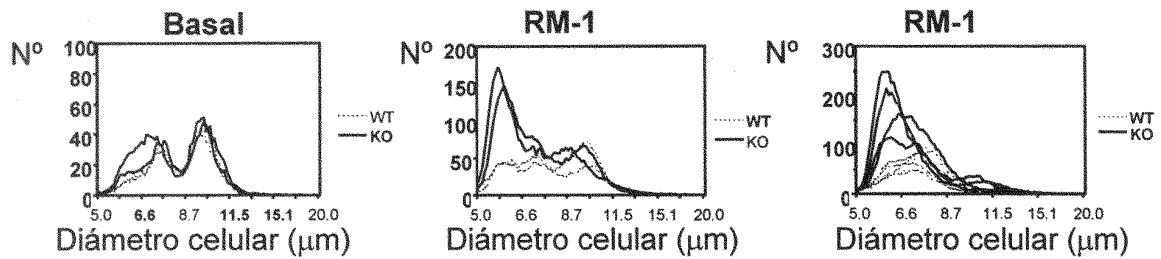


Fig. 11-D

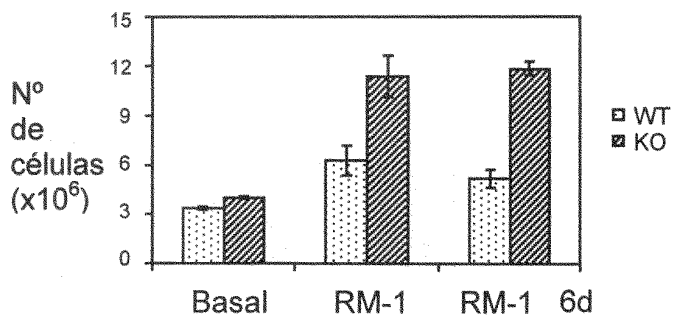


Fig. 11-E

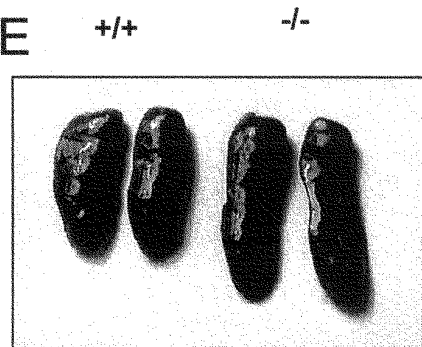


Fig. 12-A

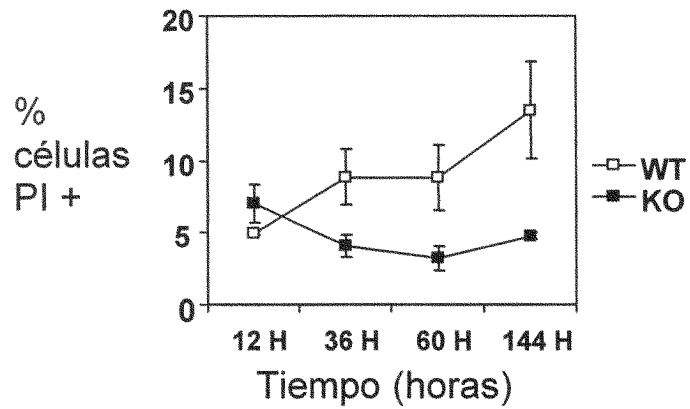


Fig. 12-B

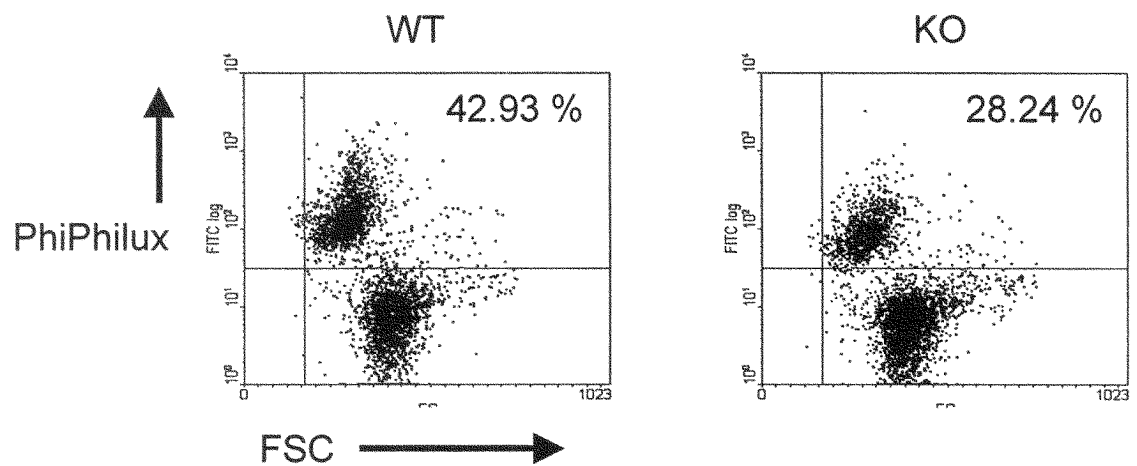


Fig. 12-C

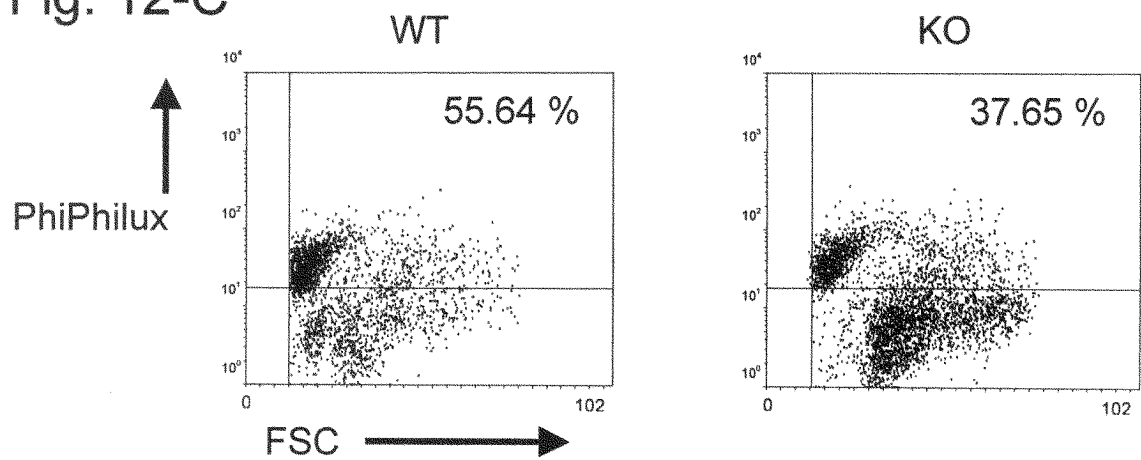


Fig. 13-A

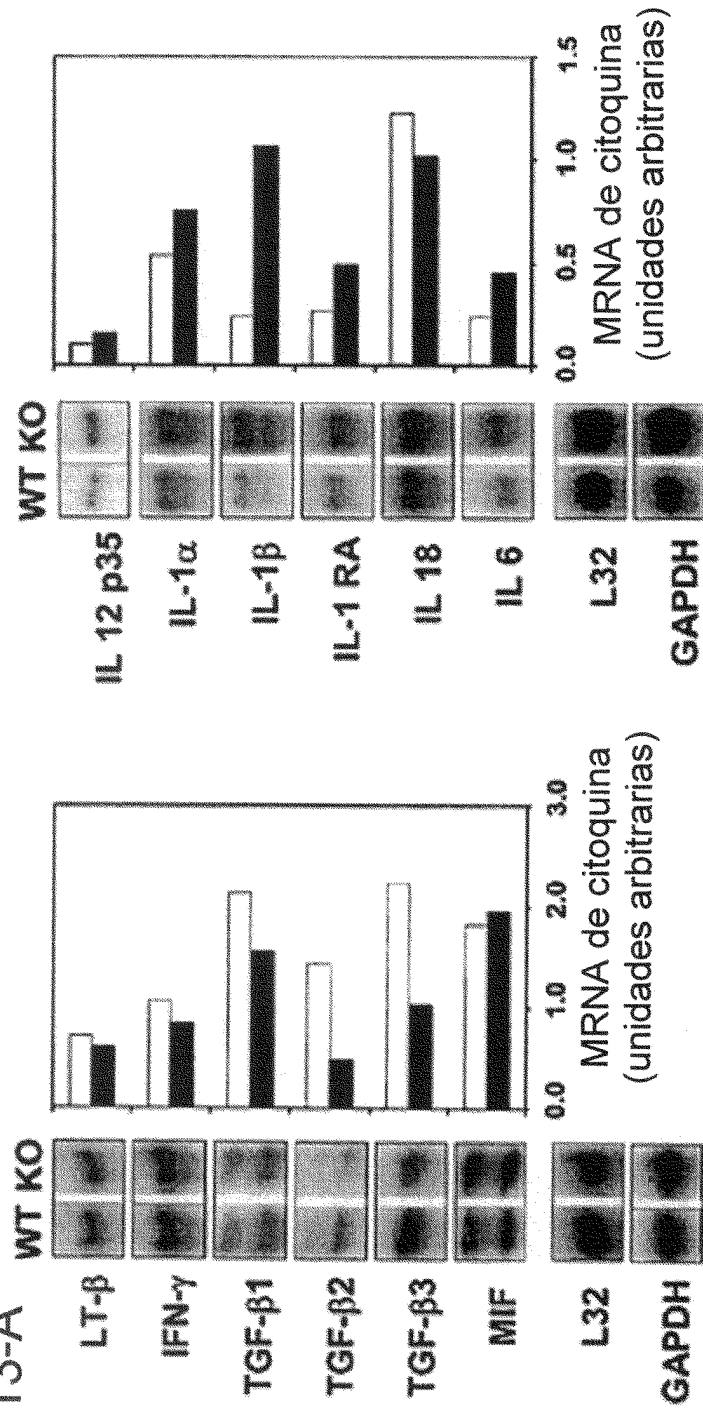


Fig. 13-B

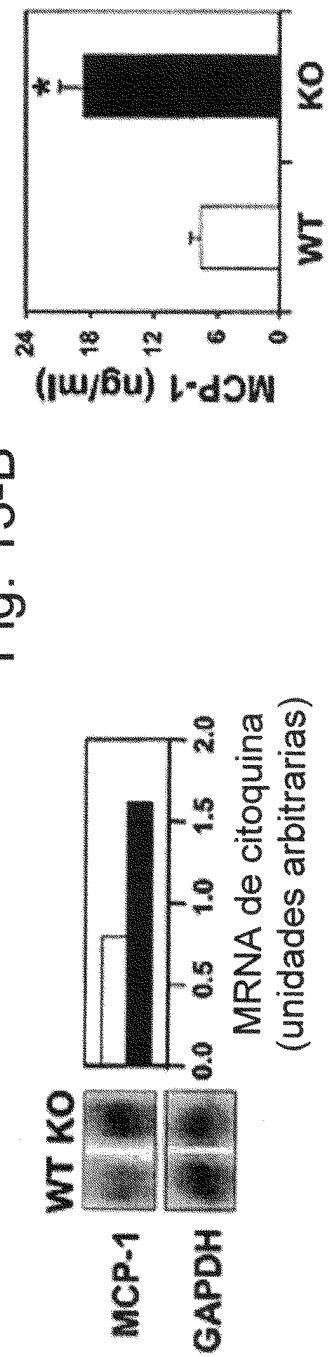


Fig. 14

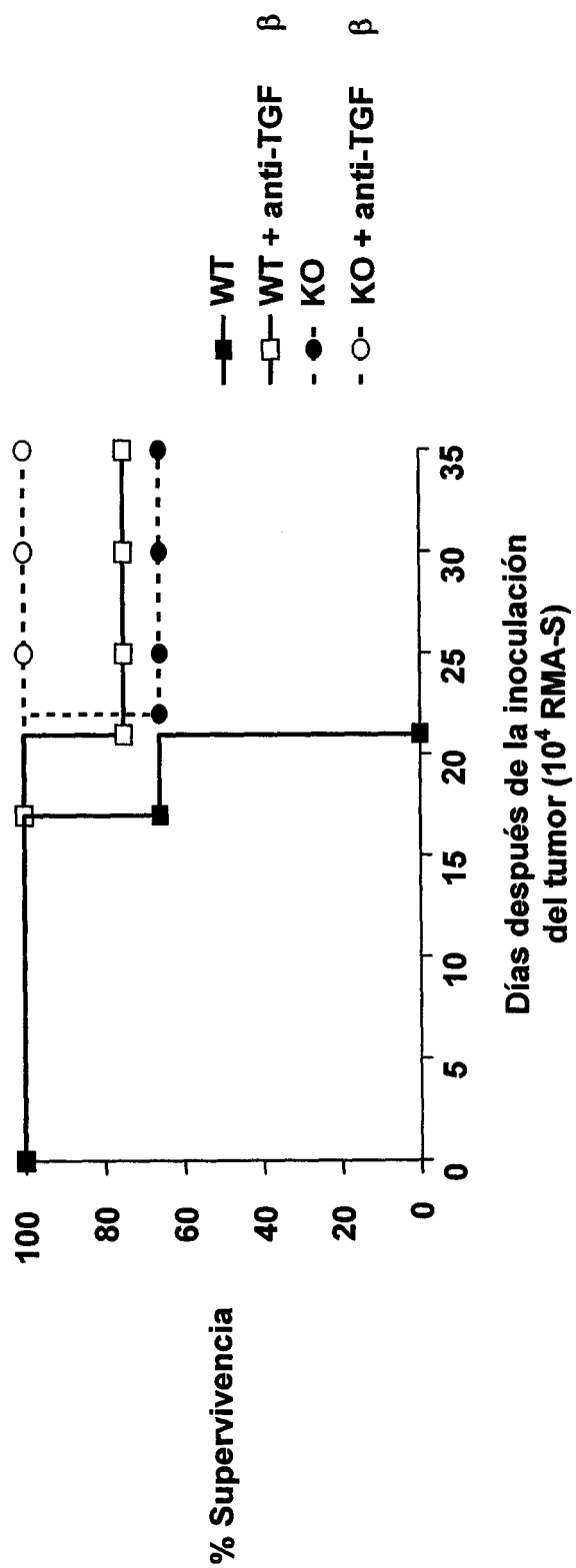


Fig. 15-A

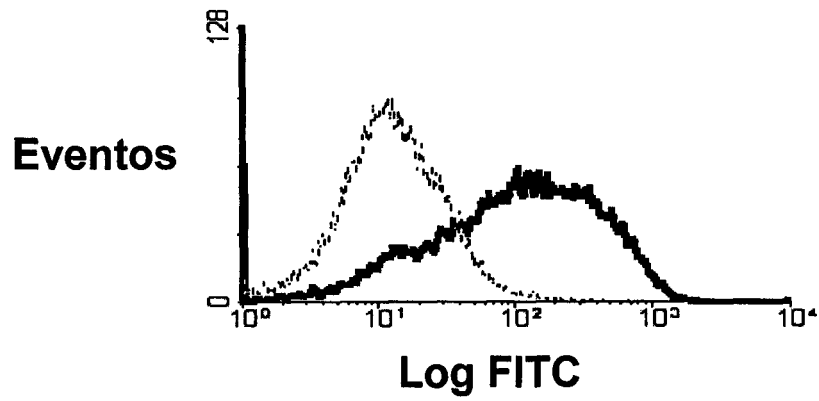


Fig. 15-B

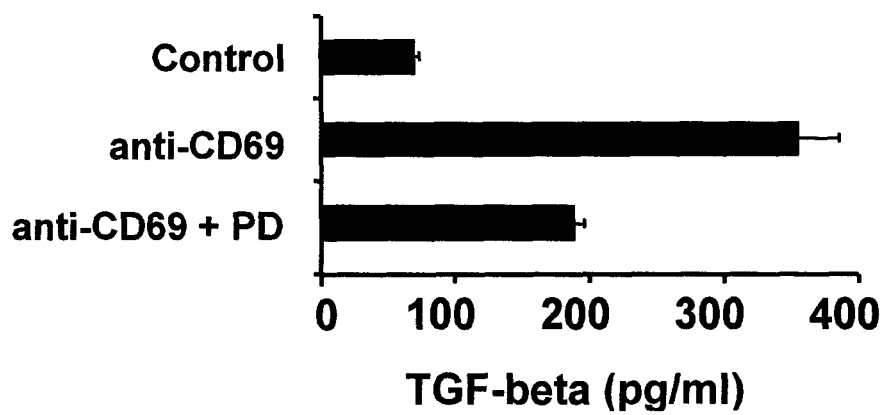


Fig. 15-C

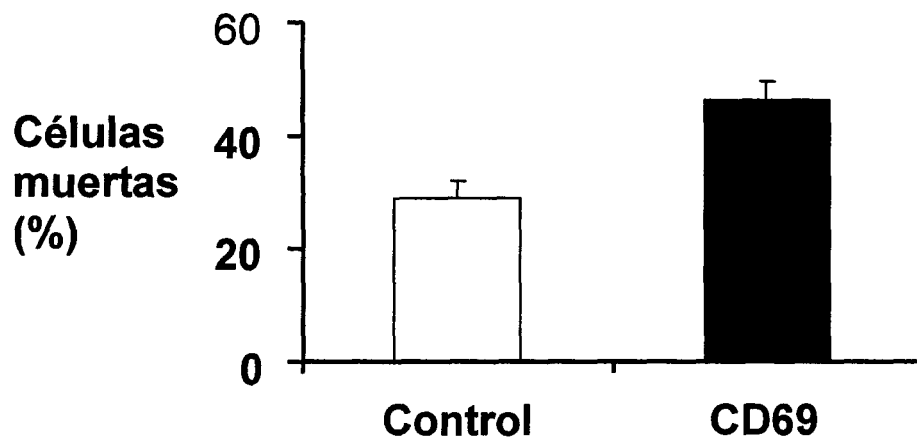


Fig. 15-D

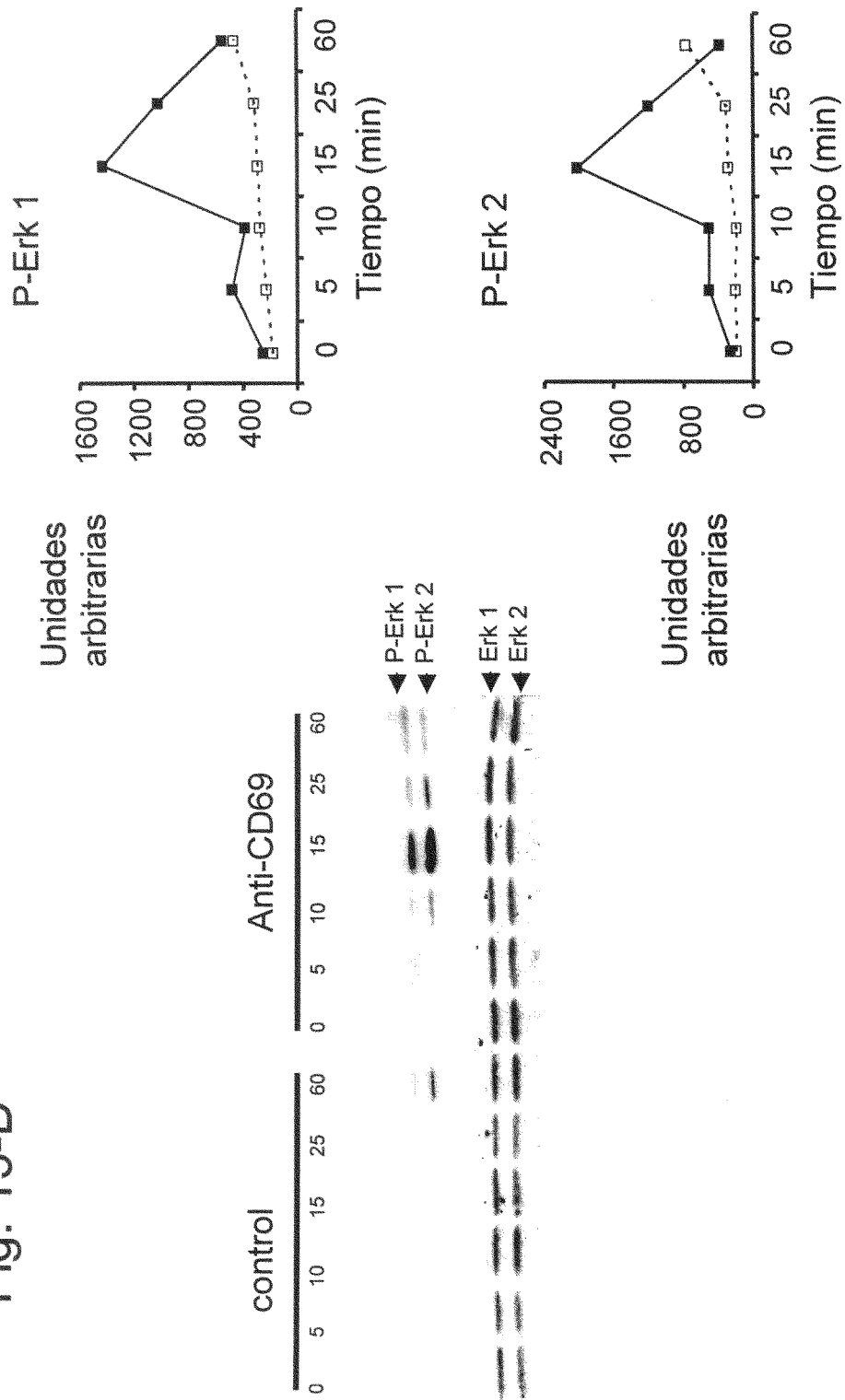


Fig. 16-A

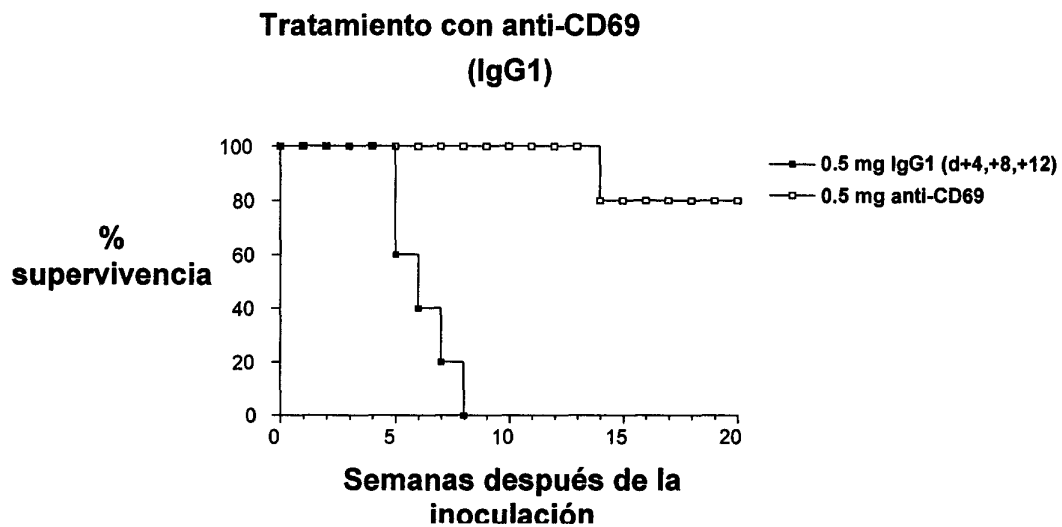


Fig. 16-B

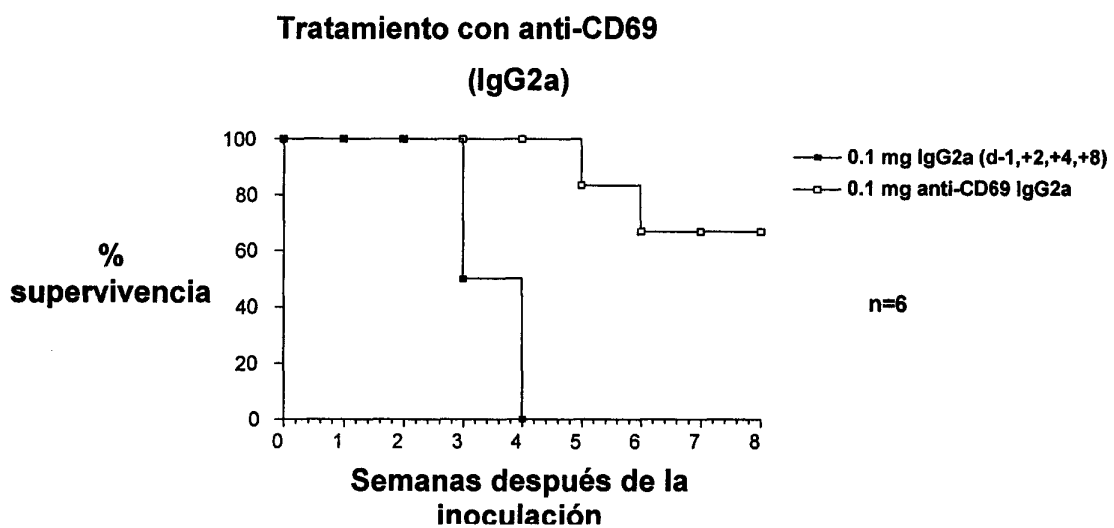


Fig. 16-C

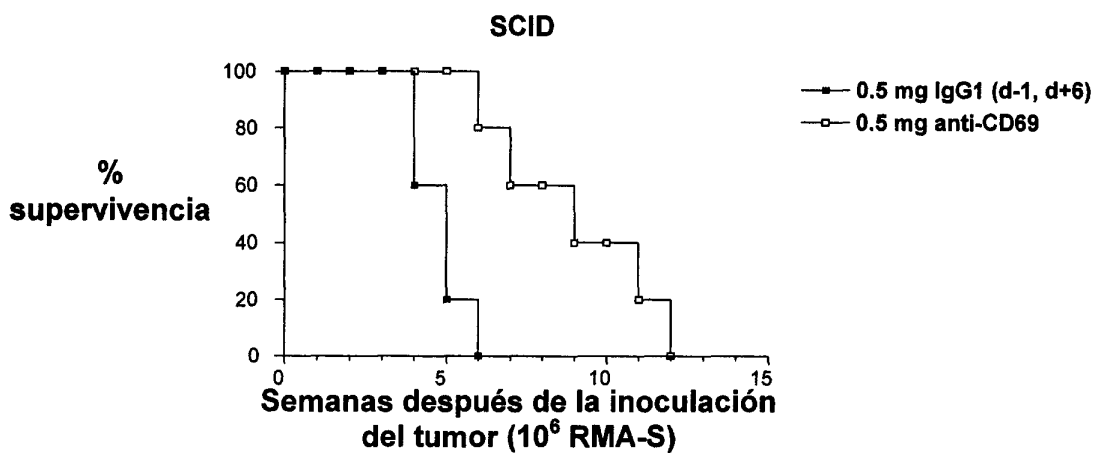


Fig. 17-A

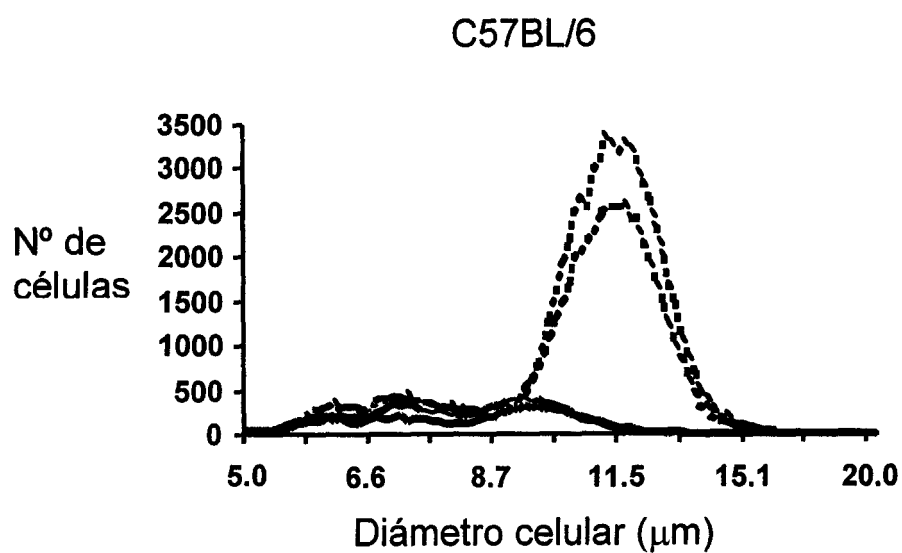
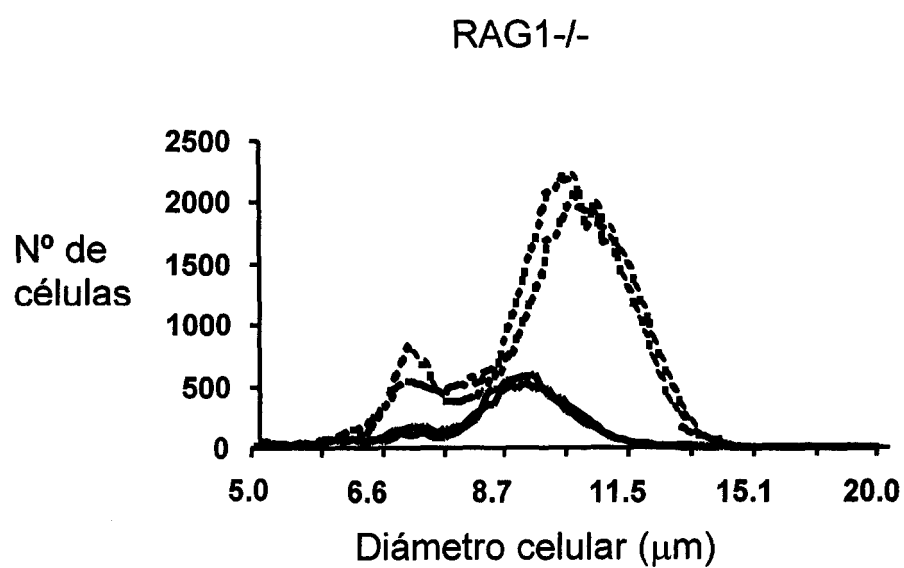


Fig. 17-B



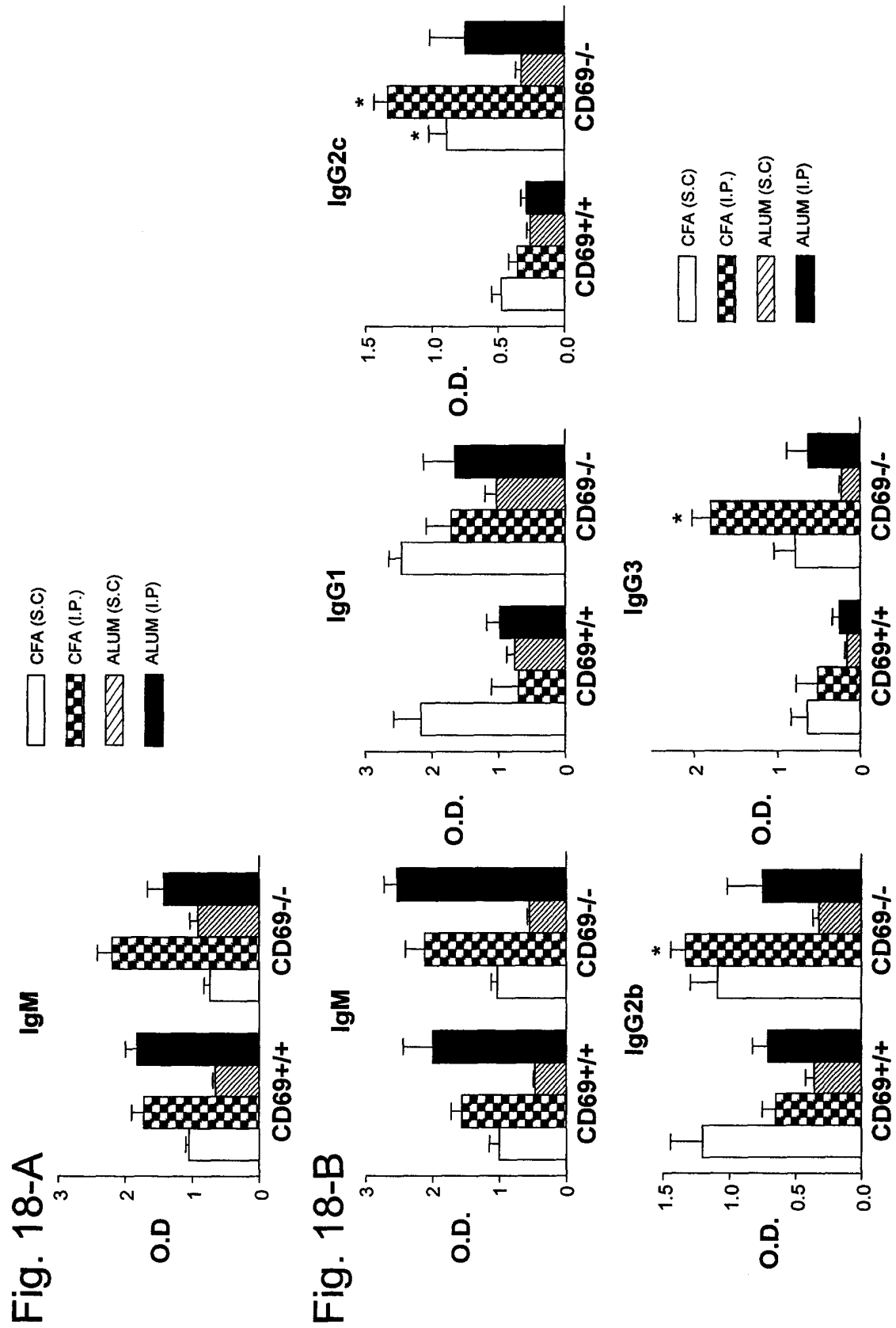


Fig. 19

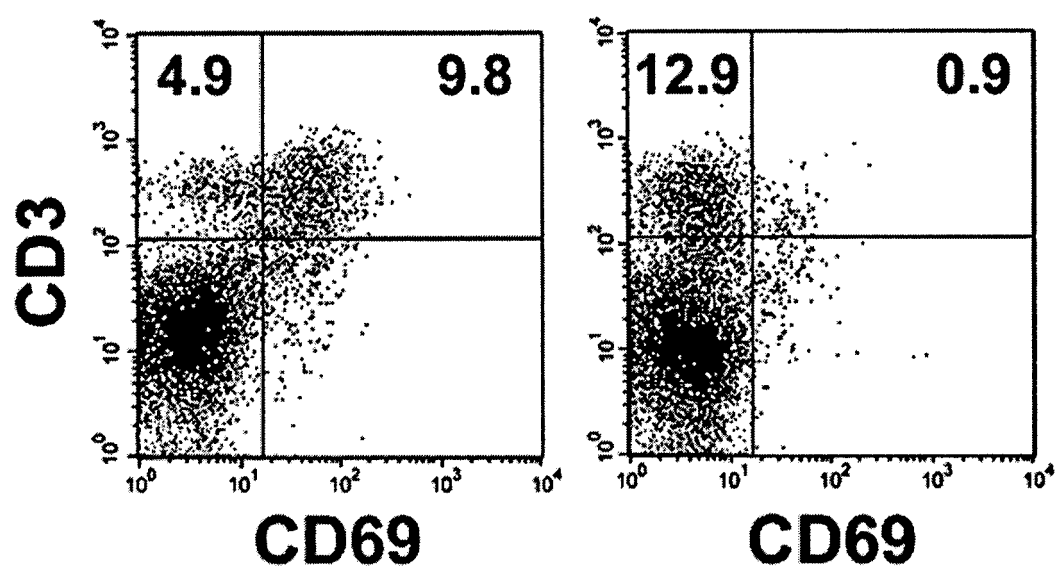


Fig. 20

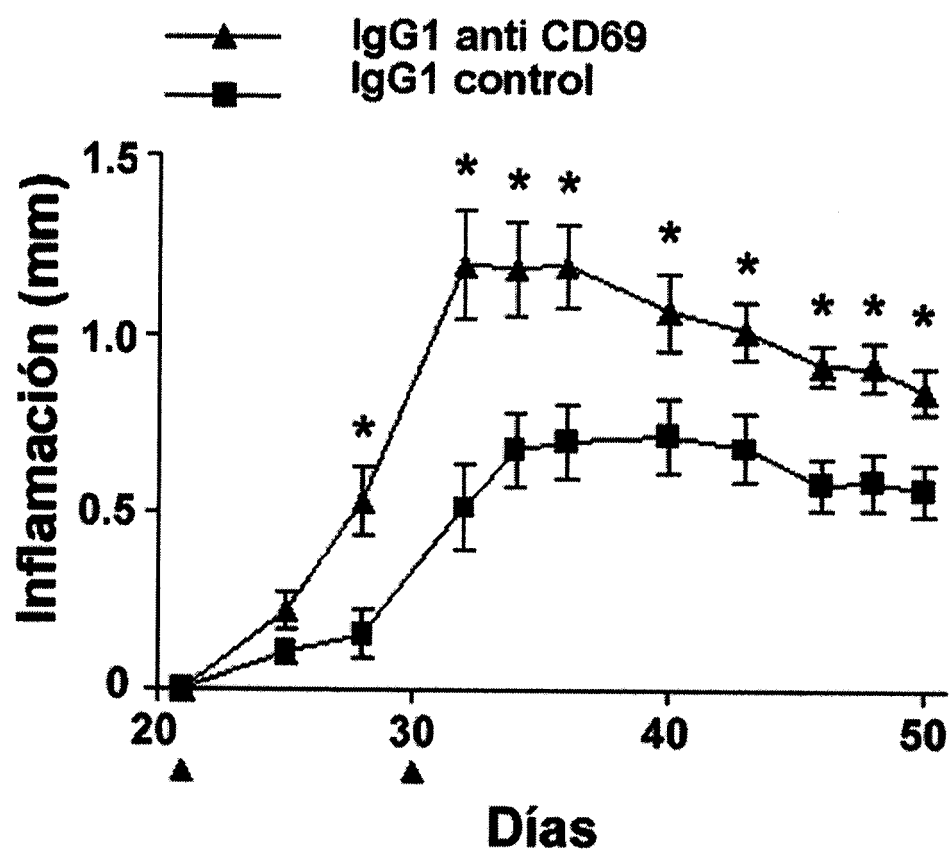


Fig. 21

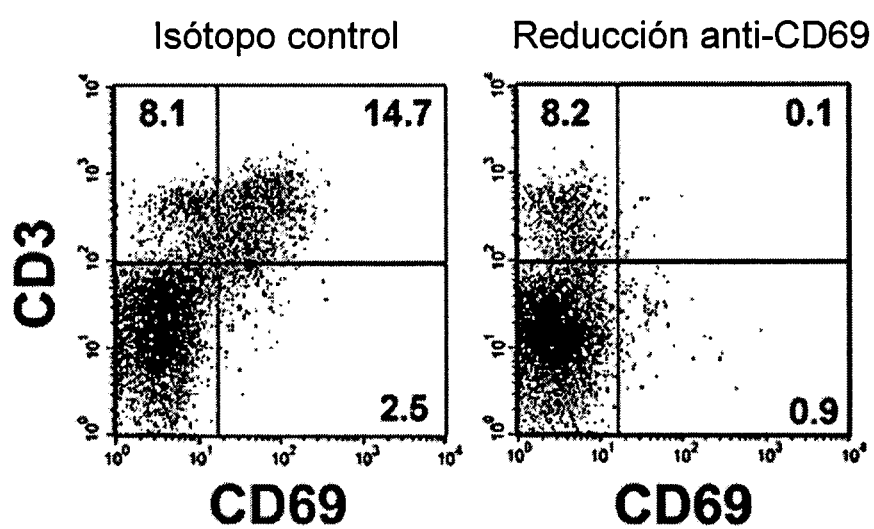
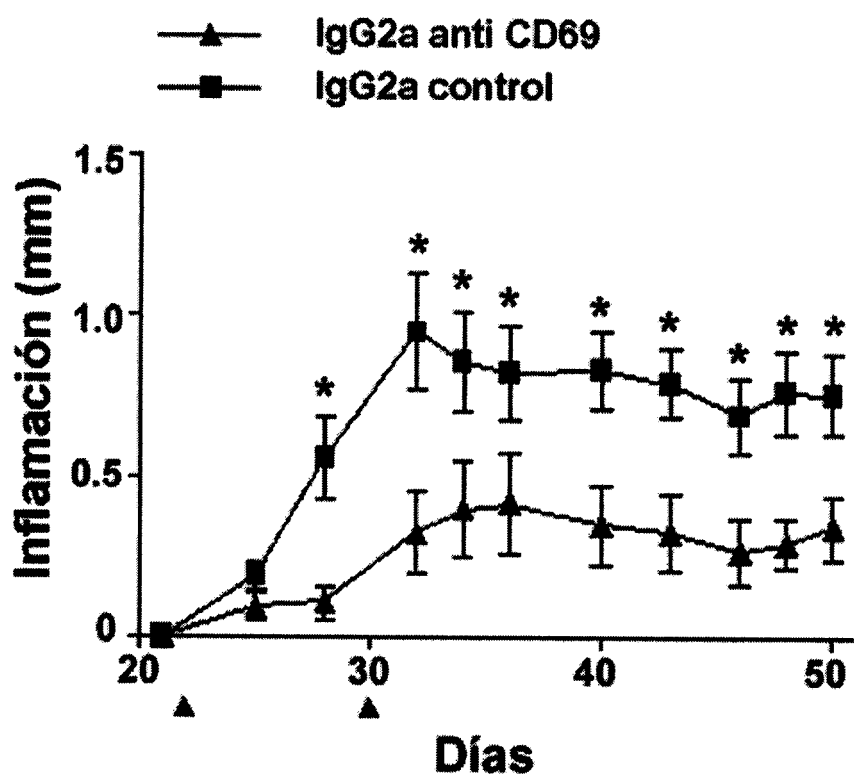


Fig. 22



ES 2 244 297 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid, Centro Superior de Investigaciones Científicas, Lauzurica, Pilar.

5 <120> Mejoras en el desarrollo de una nueva estrategia de regulación inmune fundamentada en la molécula inducible durante la activación leucocitaria CD69.

<130> 200300252

10

<140> Spanish patent number 200300252

<141> 2003-01-31

15

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 1702

<212> DNA

25

<213> *Homo sapiens*.

<300>

<301> Posselt, A.M., Vincenti, F., Bedolli, M., Lantz, M., Roberts, J.P. and Hirose, R.

<302> CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients.

30

<303> Transplantation.

<304> 76

<305> 1

35

<306> 190-195

<307> 2003

<308> NM_001781

<309> 2003-10-05

40

<313> (1)..(1702)

<300>

<308> NM_001781

45

<309> 2003-10-05

<400> 1

agactcaaca agagctccag caaagacttt cactgtagct tgacttgacc tgagattaac 60

50

tagggaatct tgagaataaa gatgagctct gaaaattgtt tcgtagcaga gaacagctct 120

ttgcatccgg agagtggaca agaaaatgat gccaccagtc cccatttctc aacacgtcat 180

55

gaagggtcct tccaagtcc tgcctgtgt gctgtaatga atgtggtctt catcaccatt 240

ttaatcatag ctctcattgc cttatcagtg ggccaatata attgtccagg ccaatacaca 300

60

ttctcaatgc catcagacag ccatgtttct tcattgctctg aggactgggt tggctaccag 360

65

ES 2 244 297 A1

aggaaatgct actttatttc tactgtgaag aggagctgga cttcagccca aaatgcttgt 420

tctgaacatg gtgctactct tgctgtcatt gattctgaaa aggacatgaa ctttctaaaa 480

cgatacgcag gtagagagga acactgggtt ggactgaaaa aggaacctgg tcacccatgg 540

aagtgggtcaa atggcaaaga atttaacaac tgggtcaacg ttacagggtc tgacaagtgt 600

gtttttctga aaaacacaga ggctcagcagc atggaatgtg agaagaattt atactggata 660

tgtaacaaac cttacaaata ataaggaaac atgttcactt attgactatt atagaatgga 720

actcaaggaa atctgtgtca gtggatgctg ctctgtggtc cgaagtcttc catagagact 780

ttgtgaaaaa aaattttata gtgtcttggg aattttcttc caaacagAAC tatggaaaaa 840

aaggaagaaa ttccaggaaa atctgcactg tgggctttta ttgcatgag ctagaagcat 900

cacaggttga ccaataacca tgcccaagaa tgagaagaat gactatgcaa cctttggatg 960

cactttatat tattttgaat ccagaaataa tgaaataact aggcgtggac ttactattta 1020

ttgtgaatg actaccaaca gtgagagccc ttcattgcatt tgcactactg gaaggagtta 1080

gatgttggtg ctgatactg aatgtaaaca aaggaattat ggctggtaac ataggttttt 1140

agtctaattg aatcccttaa actcaggag catttataaa tggacaaatg cttatgaaac 1200

taagatttgt aatatttctc tctttttaga gaaatttggc aatttacttt gttatttttc 1260

cccaaaaaga atgggatgat cgtgtattta ttttttact tctcagctg tagacaggtc 1320

cttttcgatg gtacatat ttttgccctt ataactttt atacagtgtc ttacagagaa 1380

aagacataag caaagactat gaggaatatt tgcaagacat agaatagtgt tggaaaatgt 1440

gcaatatgtg atgtggcaaa tctctattag gaaatattct gtaacttca gacctagaat 1500

aatactagtc ttataatagg tttgtgactt tctaaatca attctattac gtgcaatact 1560

tcaatacttc atttaaaata ttttatgtg caataaaatg tatttgttg tattttgtgt 1620

tcagtacaat tataagctgt ttttatatat gtgaaataaa agtagaataa acacaaaaaa 1680

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1702

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

ES 2 244 297 A1

<213> *Homo sapiens*.

<300>

<301> Posselt, A.M., Vincenti, F., Bedolli, M., Lantz, M., Roberts, J.P. and Hirose, R.

5 <302> CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients.

<303> Transplantation.

<304> 76

<305> 1

10

<306> 190-195

<307> 2003

<308> NP_001772

15

<309> 2003-10-05

<313> (1)..(199)

<300>

<308> NP001772

20

<309> 2003-10-05

<400> 2

25

Met Ser Ser Glu Asn Cys Phe Val Ala Glu Asn Ser Ser Leu His Pro
1 5 10 15

30

Glu Ser Gly Gln Glu Asn Asp Ala Thr Ser Pro His Phe Ser Thr Arg
20 25 30

35

His Glu Gly Ser Phe Gln Val Pro Val Leu Cys Ala Val Met Asn Val
35 40 45

40

Val Phe Ile Thr Ile Leu Ile Ile Ala Leu Ile Ala Leu Ser Val Gly
50 55 60

45

Gln Tyr Asn Cys Pro Gly Gln Tyr Thr Phe Ser Met Pro Ser Asp Ser
65 70 75 80

50

His Val Ser Ser Cys Ser Glu Asp Trp Val Gly Tyr Gln Arg Lys Cys
85 90 95

55

Tyr Phe Ile Ser Thr Val Lys Arg Ser Trp Thr Ser Ala Gln Asn Ala
100 105 110

60

Cys Ser Glu His Gly Ala Thr Leu Ala Val Ile Asp Ser Glu Lys Asp
115 120 125

65

ES 2 244 297 A1

Met Asn Phe Leu Lys Arg Tyr Ala Gly Arg Glu Glu His Trp Val Gly
130 135 140

5

Leu Lys Lys Glu Pro Gly His Pro Trp Lys Trp Ser Asn Gly Lys Glu
145 150 155 160

10

Phe Asn Asn Trp Phe Asn Val Thr Gly Ser Asp Lys Cys Val Phe Leu
165 170 175

15

Lys Asn Thr Glu Val Ser Ser Met Glu Cys Glu Lys Asn Leu Tyr Trp
180 185 190

20

Ile Cys Asn Lys Pro Tyr Lys
195

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 244 297

⑫ Nº de solicitud: 200302587

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 05.11.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: A61K 39/395, C07K 14/705, A61P 37/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	ES 2192128 A1 (UNIVERSIDAD DE VIGO) 16.09.2003, todo el documento.	10-27
A	ISHIKAWA, S.; AKAKURA, S.; ABE, M. et al. A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. The Journal of Immunology. Agosto 1998, Vol. 161, Nº 3, páginas 1267-1273. ISSN 0022-1767.	1-13
A	REDDISH, M.A.; MacLEAN, G.D.; POPPEMA, S. et al. Pre-immunotherapy serum CA27.29 (MUC-1) mucin level and CD69+ lymphocytes correlate with effects of theratope sialyl-Tn-KLH cancer vaccine in active specific immunotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII. Junio 1996, Vol. 42, Nº 5, páginas 303-309. ISSN 0340-7004.	1-9
A	LAUZURICA, P.; SANCHO, D.; TORRES, M. et al. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. Blood. Abril 2000, Vol. 95, Nº 7, páginas 2312-2320. ISSN 0006-4971.	1-9
A	WO 1995021618 A1 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 17.08.1995, página 1; página 4, línea 21 - página 8, línea 23; página 13, línea 25 - página 20, línea 24; página 23, líneas 6-16.	1-14,16,17,19,21
A	D'ARENA, G.; MUSTO, P.; NUNZIATA, G. et al. CD69 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic marker?. Haematologica. Septiembre 2001, Vol. 86, Nº 9, páginas 995-996. ISSN 0390-6078.	22,23,25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.10.2005

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 244 297

⑫ Nº de solicitud: 200302587

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 05.11.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: A61K 39/395, C07K 14/705, A61P 37/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DAMLE, R.N.; GHIOTTO, F.; VALETTO, A. et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. Blood. Junio 2002, Vol. 99, Nº 11, páginas 4087-4093. ISSN 0006-4971.	22,23,24, 27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.10.2005

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

2/2